全国高等学校配套教材

供预防医学类专业用

毒理学
实验方法与技术

主　审　张　桥

主　编　王心如

副主编　周宗灿

人民卫生出版社

全国高等学校配套教材

供预防医学类专业用

毒理学实验方法与技术

主　审　张　桥

主　编　王心如

副主编　周宗灿

编　者（以姓氏笔画为序）

王心如（南京医科大学公共卫生学院）
石　年（华中科技大学公共卫生学院）
朱心强（浙江大学公共卫生学院）
庄志雄（中山大学公共卫生学院）
孙志伟（吉林大学公共卫生学院）
李百祥（哈尔滨医科大学公共卫生学院）
周建伟（南京医科大学公共卫生学院）
周宗灿（北京大学公共卫生学院）
金泰廙（复旦大学公共卫生学院）
钟才高（中南大学公共卫生学院）
胡渝华（四川大学公共卫生学院）
谢克勤（山东大学公共卫生学院）
裴秋玲（山西医科大学公共卫生学院）
蔡　原（中国医科大学公共卫生学院）

秘　书　肖　杭（南京医科大学公共卫生学院）

人民卫生出版社

图书在版编目(CIP)数据

毒理学实验方法与技术/王心如主编.—北京:
人民卫生出版社,2003.7
ISBN 7-117-05661-4

Ⅰ.毒… Ⅱ.王… Ⅲ.毒理学-实验
Ⅳ.R99-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2003)第 058306 号

毒理学实验方法与技术

主　　编:王 心 如
出版发行:人民卫生出版社(中继线 67616688)
地　　址:(100078)北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼
网　　址:http://www.pmph.com
E - mail:pmph @ pmph.com
印　　刷:北京市增富印刷有限责任公司(万通)
经　　销:新华书店
开　　本:787×1092　1/16　　**印张**:13.5
字　　数:302 千字
版　　次:2003 年 8 月第 1 版　2003 年 8 月第 1 版第 1 次印刷
标准书号:ISBN 7-117-05661-4/R·5662
定　　价:18.00 元

编写说明

毒理学是研究化学、物理和生物因素对机体的损害作用、生物学机制、危险度评价和危险度管理的科学。毒理学兼有基础科学和应用科学的鲜明特征，是现代医学尤其是公共卫生预防医学专业中一门重要的基础课程。纵观毒理学发展史，她源于实验医学和治疗学，而实验毒理学也促进了现代医学的发展。编者认为，毒理学基础理论与实践技能对于高素质、创新性预防医学专业人才的培养具有同等重要的地位，尝试编写实习教材《毒理学实验方法与技术》正是基于这一主要观点和根本目的。

全书共分 12 章约 20 余万字：前 3 章重点介绍了毒理学实验基础、一般毒性和特殊毒性试验方法与技术；后 9 章主要描述了靶器官（血液、免疫、生殖、神经系统和行为、呼吸、肝脏、肾脏、心血管和皮肤）毒理学研究方法与技术。本教材具有与上篇《毒理学基础》前后衔接、传统和经典实验方法与现代生物和测试分析技术紧密结合以及适用性和可操作性强等主要特点。

本书可用作全国高等医药院校本科生、研究生的毒理学实习教材或科研入门的参考书，各院校可根据不同的培养规格、目标与要求以及自身的实验教学条件，精心组织、科学选择适当的实验方法与技术，开展以问题为中心（PBL）、形式多样的设计性和综合性实验教学活动。

本版教材的编写得到了卫生部教材办公室和人民卫生出版社的直接指导和大力支持，参加编写的各位专家、教授和中山大学公共卫生学院张桥教授付出了辛勤工作的汗水，我们谨此一并表示最诚挚的感谢。限于时间和水平，本教材定有错误和不妥之处，敬请广大师生提出宝贵意见，以便今后进一步修订使之日臻完善。

王心如　周宗灿

2003 年 5 月

目　录

第一章

毒理学实验基础

毒理学研究外源化学物对于机体(特别是人体)的有害作用及其机制。毒理学研究的主要手段是动物实验。体内试验是以实验动物为模型,最终目的是通过外源化学物对实验动物的毒性反应,向人(原型)外推,以期评估外源化学物对人的危害及危险性。体外实验主要用于筛选和预测急性毒性和机制研究;人体实验和流行病学调查则可进一步深化和证实在动物实验中所得到的资料。实际上,毒理学作为一门实验科学是以动物实验为中心的,毒理学动物实验的设计、实施、结果观察和评价是毒理学研究的基本功。毒理学试验是对化学物安全性评价的主要手段,已为各国际组织或各国的行政部门所颁布的规程或指南列为常规试验,又称为法规毒理学试验(regulatory toxicology test)。这类毒理学试验是以筛查和描述外来化学物的毒性为目的,属于描述毒理学范畴。当受试物经法规毒理学的研究,确定其危害、剂量反应关系和靶器官后,应进一步研究其靶器官毒理学及其毒作用机制。

第一节　毒理学实验的原则和局限性

在描述毒理学的试验中,有三个基本的原则:

1. 化学物在实验动物产生的作用,可以外推于人。基本假设为:①人是最敏感的动物物种;②人和实验动物的生物学过程包括化学物的代谢,与体重(或体表面积)相关。这两个假设也是全部实验生物学和医学的前提。以单位体表面积计算在人产生毒作用的剂量和实验动物通常相近似。而以体重计算则人通常比实验动物敏感,差别可能达 10 倍。因此可以利用安全系数来计算人的相对安全剂量。已知人致癌物都对某种实验动物具有致癌性。实验动物致癌物是否都对人有致癌性,还不清楚,但此已作为动物致癌试验的基础。一般认为,如果某一化学物对几个物种实验动物的毒性是相同的,则人的反应也可能是相似的。

2. 实验动物必须暴露于高剂量,这是发现对人潜在危害的必需和可靠的方法。此原则是根据质反应的概念,随剂量或暴露增加,群体中效应发生率增加。毒理学试验中,一般要设 3 个或 3 个以上剂量组,以观察剂量-反应(效应)关系,确定受试化学物引起的毒效应及其毒性参数。毒性试验的设计并不是为了证明化学品的安全性,而是为了了解化学品可能产生的毒作用。仅仅检测受试化学物在人的暴露剂量是否引起毒效应是不够的,尽管此剂量已超过人可能的暴露剂量。当引起毒效应的最低剂量(LOAEL)与人的暴

露剂量接近时，说明该化学物不安全。当该剂量与人的暴露剂量有很大的距离（几十倍，几百倍或以上），才认为具有一定安全性，此距离越大，安全性越可靠。如果在研究中所用的一系列的剂量不能引起毒性效应，则认为所用剂量还不足够高，应增加剂量，以确定受试化学品的毒性。但如果在试验的最高剂量组的剂量与人可能的暴露剂量有足够的安全界限，则对于安全性评价来说未观察到毒效应的研究是可以接受的。在毒理学试验中实验模型所需的动物总是远少于处于危险中的人群。为了在少量动物得到有统计学意义的可靠的结果，需要应用相对较高的剂量，以使效应发生的频率足以被检测到。例如，低达0.01%的癌症发生率，这意味着在100万人群中有100人发生癌症，此发生率太高，不能为公众接受。在实验动物直接检测如此低发生率将至少需要30000只动物。因此，在毒理学试验中，对相对较少的实验动物必须以较高剂量进行试验，然后根据毒理学原则外推估计低剂量的危险性。

3. 成年的健康（雄性和雌性未孕）实验动物和人可能的暴露途径是基本的选择。成年的健康（雄性和雌性未孕）实验动物是为了使实验结果具有代表性和可重复性。以成年的健康（雄性和雌性未孕）实验动物作为一般人群的代表性实验模型，而将幼年和老年动物、妊娠的雌性动物、疾病状态作为特殊情况另作研究。这样可降低实验对象的多样性，减少实验误差。毒理学实验结果的敏感性取决于受试物处理引起毒效应强度和实验误差两个因素，处理引起的毒效应强，实验误差小，则实验结果的敏感性增加，反映受试物处理的真实效应，反之亦然。实验设计是要规定实验条件，严格控制可能影响毒效应的各种因素，保证实施质量，降低实验误差。只有这样，才能保证试验结果的准确性和可重现性。外源化学物从不同途径染毒实验动物所表现的毒性可有很大差异，这是由于染毒部位解剖生理特点不同，外源化学物吸收进入血液的速度和量也不同，首先到达的器官和组织也不同。因此，毒理学试验中染毒途径的选择，应尽可能模拟人接触该受试物的方式。

历史上，环境污染物及某些药物所引起的中毒和死亡多次发生，引起各国的重视，推动了毒理学的发展，各国政府主管部门制订和多次修订了有关药品和各种化学品安全性评价的规范或准则，希望在啮齿类和非啮齿类的毒理学研究能为有关候选新药和各种化学品提供安全性证据，但以动物的资料预测人的毒性的预测价值尚有待于研究。Lumley（1990）和Igarashi（1994）根据有限的临床资料报告对人的毒性约一半不能由临床前（动物）毒性研究预测。Heywood（1983）报告27个化学物（大多为药品）的靶器官毒性在大鼠和犬（或猴）之间的相符率仅20%。Olson等（1998）报告131种化学物对动物的毒性与人的毒性相符率，啮齿类为6%、非啮齿类（犬和猴）为28%，合并达36%，所有的物种相符率可达69%。按照目前的规范，进行毒理学安全性评价，可以在一定程度上提高新药和各种化学品的使用安全性，但仍不能完全排除对人健康危害的风险。WHO在《临床前药物安全性实验原则》的文件中指出"虽然事先对生物活性物质进行了最仔细彻底的研究，但给人使用时总是不可避免地要冒一定的风险。"这就是利用动物实验的局限性，即动物实验的结果外推到人的不确定性。

用实验动物的毒理学试验资料外推到人群接触的安全性时，会有很大的不确定性。这是因为，外源化学物的毒性作用受到许多因素的影响。首先，实验动物和人对外源化学物的反应敏感性不同，有时甚至存在着质的差别。虽然在毒理学试验中通常用两种或两种以上的动物，并尽可能选择与人对毒物反应相似的动物，但要完全避免物种差异是不可

能的。而且，实验动物不能述说涉及主观感觉的毒效应，如疼痛、腹胀、疲乏、头晕、眼花、耳鸣等，这些毒效应就难以或不可能发现。在动物实验中，可观察到体征（sign），而没有"症状（symptom）"。第二，在毒理学试验中，为了寻求毒作用的靶器官，并能在相对少量的动物上就能得到剂量-反应或剂量-效应关系，往往选用较大的染毒剂量，这一剂量通常要比人实际接触的剂量大得多。有些化学物在高剂量和低剂量的毒性作用规律并不一定一致，如大剂量下出现的反应有可能是由于化学物在体内超过了机体的代谢能力，这就存在高剂量向低剂量外推的不确定性。第三，毒理学试验所用动物数量有限，那些发生率很低的毒性反应，在少量动物中难以发现。而化学物一旦进入市场，接触人群往往会很大。这就存在小数量实验动物到大量人群外推的不确定性。第四，实验动物一般都是实验室培育的品系，一般选用成年健康动物，反应较单一，而接触人群可以是不同的人种、种族，而且包括年老体弱及患病的个体，在对外源化学物毒性反应的易感性上存在很大差异。以上这些都构成了从毒理学动物试验结果向人群安全性评价外推时的不确定因素。

第二节 毒理学毒性评价试验的基本目的

毒理学实验的常规部分是毒性评价或安全性评价试验。为了对受试物的毒性进行全面的测试，增强测试结果的可靠性，权威机构规定了评价程序，以保证毒性评价研究可以达到普遍能接受的最低要求和原则。由于受试物的多样性，试验程序应该有一定的灵活性。对毒理学试验的原理和设计思路的深入理解，有助于研究者对评价程序的实施，在发现新的现象或线索时，可进一步设计新的实验来证实，并研究其机制。

毒性评价或安全性评价方面的基本目的包括以下几点：

1. 受试物毒作用的表现和性质　在急性和慢性毒性试验中，观察受试物对机体的有害作用，对每个实验动物进行全面的逐项的观察和记录。发现有害作用是进行剂量-反应（效应）研究的前提。

2. 剂量-反应（效应）研究　剂量-反应（效应）研究是毒性评价和安全性评价的基础。通过对不同有害作用的剂量-反应（效应）研究，可以得到该受试物的多种毒性参数。在急性（致死性）毒性试验中，应该得到 LD_{50}，也可以得到 LD_0 和 MTD。在急性非致死性毒性试验中，应该得到急性可观察到有害作用的最低剂量（LOAEL）和未观察到有害作用的剂量（NOAEL）。在亚急性、亚慢性及慢性毒性试验中，应该得到相应的 LOAEL 和 NOAEL。在致突变、致癌和致畸等特殊毒性试验中，剂量-反应（效应）研究将为确定受试物是否具有这些特殊毒性提供依据。在致畸试验也可得到 LOAEL 和 NOAEL；在致突变、致癌试验中，尽管认为是无阈值的，但也可得到表观的 LOAEL 和 NOAEL。

3. 确定毒作用的靶器官　确定受试物有害作用的靶器官，是毒理学研究的重要目的，以阐明受试物毒作用的特点，并为进一步的机制研究和毒性防治提供线索。

4. 确定损害的可逆性　一旦确认有害作用存在，就应研究停止接触后该损害是否可逆和消失，器官和组织功能是否能恢复，还是像化学致癌作用那样停止接触后损害继续发展。毒性的可逆性关系到对人的危害评价，如果受损的器官组织能够修复并恢复正常功能，则可能接受较高危险性的接触水平。

当然，毒理学研究还可能有其他的目的和要求，例如毒作用的敏感检测指标和生物学

标志、毒作用机制研究、受试物的毒物动力学和代谢研究、中毒的解救措施等。对这些要求,应扩展常规试验的设计以包括有关的项目,或者另外设计和进行靶器官毒理学研究及机制毒理学研究。

第三节 动物实验的职业道德

实验动物(laboratory animal)包括所有脱离自然环境而用于研究、教学和试验的脊椎动物。要预防和治疗人类的疾病、要认识生命过程,生物学实验是必不可少的。实验动物对医学的发展有不可忽视的贡献。所有的研究人员要尊重生命,善待实验动物。

关于人类对待动物的伦理学争论由来已久。18世纪哲学家Jeremy Bethan指出:"问题既不是它们能否思考,也不是它们会不会说话,而是它们痛苦不痛苦。"也出版了很多有关动物的伦理学的书籍和文章。19世纪以来兴起了动物保护主义,各国成立各种动物保护组织,其中有一部分是主张绝对禁止动物实验的激进派。科学家和大多数民众则主张对动物实验加以规范,通过立法保障动物福利。英国1822年通过了马丁法,禁止虐待动物;1876年通过了"禁止虐待动物法";1986年通过了"科学实验动物法"。美国1873年联邦法中有人道地对待动物的条文;1966年通过了"动物福利法"。我国《实验动物管理条例》规定"对实验动物必须爱护,不得戏弄或虐待"。

对于那些人为造成丧失独立生存能力的生物和那些用于研究、教学的试验的动物,我们都负有道义上的责任。使用有知觉动物作研究时,其前提必须期望该研究对最终能使人类或动物的健康和福利得到改进的认识有重大的贡献。遵守下列原则:①给予人道主义的管理和处理;②使痛觉和不适感减少到最低限度;③避免不必要的使用实验动物。合适的建筑设备固然重要,但更重要的是管理体制和使用实验动物的各级人员的知识水平和对动物的关心程度。

应贯彻英国William Russell和Rex Brursh(1959)在《The Principles of Humane Experimental Technique》提倡的3R原则,即替代(replacement)、减少(reduction)和优化(refinement)。替代是指应用无知觉材料的科学方法来代替使用活的有知觉脊椎动物的方法。减少是指在能保证获取一定数量与精确度的数据信息的前提下,减少动物的使用数量。优化是指在必须使用动物时,要尽量减少非人道程序的影响范围和程度。

第四节 实验动物的选择和管理

毒理学的动物实验是以实验动物作为研究对象的,为获得可靠的研究结果,先决条件是正确地选用实验动物。

(一) 实验动物物种的选择

外源化学物的固有毒性往往在人和不同物种实验动物之间表现不同,物种差别可以表现在量和质的差别。因此,需要对实验动物物种进行选择。一般认为,从动物实验结果外推到人,定性外推的可靠性高于定量外推,毒效学预测优于毒动学预测。

对实验动物物种选择的基本原则是:在代谢、生物化学和毒理学特征与人最接近的物种;自然寿命不太长的物种;易于饲养和实验操作的物种;经济并易于获得的物种。

在选择实验动物时存在固有的限制。可利用的物种不多，主要原因包括经济(购买和饲养的费用)、实验动物的寿命、行为和生活能力、处置，也许最重要的是对该物种"正常"生理和病理的资料，以及对所研究的毒性的敏感性。要利用对受试物在代谢、生物化学和毒理学特征与人最接近的物种，这就需要了解实验动物物种和人对受试化学物的吸收、生物转化等资料，但这往往并不切合实际，因为首先需要进行一系列的比较研究，而对人体的资料在动物试验之前是很难得到的。

实际上没有一种实验动物完全符合上述物种选择的原则，目前常规选择物种的方式是利用两个物种，一种是啮齿类，另一种是非啮齿类。常用实验动物的生物学和生理学参数见表1-1。系统毒性研究最常用的啮齿类是大鼠和小鼠，非啮齿类是犬。豚鼠常用于皮肤刺激试验和致敏试验，兔常用于皮肤刺激试验和眼刺激试验。遗传毒理学试验多用小鼠，致癌试验常用大鼠和小鼠，致畸试验常用大鼠、小鼠和兔。迟发性神经毒性试验常用母鸡。一般认为，如以与人相同的接触方式、大致相同的剂量水平，在两个物种有毒性反应，则人有可能以相同的方式发生毒性反应。当不同物种的毒性反应有很大的差异时，必须研究外源化学物在不同物种的代谢、动力学及毒作用机制，然后才可将实验结果外推到人。

表1-1 常用实验动物生物学和生理学参数

参数	猴	犬	猫	兔	大鼠	小鼠	豚鼠	仓鼠
成体体重(kg	3.5	14.0	3.3	3.7	0.45	0.035	0.43	0.12
寿命(年)	16	15	14	6	3	1.5	31	
水消耗(ml/d)	450	350	320	300	35	6	145	30
饲料消耗(成体,g/d	150	400	100	180	10		12	10
成体代谢[cal/(kg·d)]	158	80	80	110	130	600	100	250
体温(℃)	38.8	38.9	38.6	3[illegible].4	38.2	37.4	38.6	38.0
呼吸频率(次/min)	50 (40~60)	20 (10~30)	25 (20~30)	53 (40~65)	85 (65~110)	160 (80~240)	90 (70~100)	83 (35~130)
心率(次/min)	200	100	120	200	328	600	300	450
血压(收缩/舒张,mmHg)	159/127	148/100	155/100	110/80	130/90	120/75	77/50	108/77
出生体重(g)	500~700	1100~2200	125	100	~6	1.5	75~100	2.0
断乳时体重(g)	4400	5800	3000	100~1500	40~50	10~12	250	35
开眼(天	出生当天	8~12	8~12	10	10~12	11	出生当天	15
妊娠(天)	168	63	63	31	21	20	67	16
性周期(天)	28	22	15~28	1[illegible]~16	4~5	4~5	16~19	4
动情期(天)	1~2	7~13	9~19	30	1	1	1	1

续表

参数	猴	犬	猫	兔	大鼠	小鼠	豚鼠	仓鼠
窝数量	1	3~6	1~6	1~13	6~9	1~12	1~5	1~12
断乳年龄(周)	16~24	6	6~9	8	3~4	3	2	3~4
生殖年龄(月)	54	9	10	6~7	2~3	2	3	2
生殖期(年)	[illegible]~15	5~10	4	1~3	1	1	3	1
生殖季节	任何时间	春,秋	2~3个月,冬季	任何时间	任何时间	任何时间	任何时间	任何时间
所需面积,ft^2 *	6	8	3	3	0.4	0.4	0.7	0.34
环境温度(℃)	18~28	18~28	18~28	18~28	19~25	19~25	19~25	19~25
血容量(ml/kg)	75	79	60	53	65	80	75	85
凝血时间(s)	90	180	120	300	60	14	60	143
HCT(%红细胞)	42	45	40	42	46	41	42	50
Hb(g/100ml)	12.5	16.0	11.8	13.6	14.8	16.0	12.4	12.0

* 1ft=30.48cm

(二)实验动物品系的选择

品系(strain)是实验动物学的专用名词,指用计划交配的方法,获得起源于共同祖先的一群动物。

实验动物按遗传学控制分类可分为:①近交系:指全同胞兄妹或亲子之间连续交配20代以上而培育的纯品系动物。如小鼠有津白Ⅰ、津白Ⅱ、615、DBA/1、DBA/2、BALB/C、C3H、C57BL/6J、A和A/He等。②杂交群动物(杂交1代,F1),指两个不同的近交系之间有目的进行交配,所产生的第一代动物。③封闭群:一个种群在5年以上不从外部引进新血缘,仅由同一品系的动物在固定场所随机交配繁殖的动物群。如昆明种小鼠、NIH小鼠、LACA小鼠、F344大鼠、Wistar大鼠、SD(Sprague Dauley)大鼠等。

根据实验动物遗传的均一性排序,近交系最高、杂交群次之、封闭群较低。不同品系实验动物对外源化学物毒性反应有差别,所以毒理学研究要选择适宜的品系,对某种外源化学物毒理系列研究中应固定使用同一品系动物,以求研究结果的稳定性。

遗传毒理学一般利用啮齿类动物,主要是小鼠或大鼠。如果有合适的理由,其他物种也可接受。在致癌试验中对大鼠和小鼠常选择有关病理损害的自发发生率低的品系。

(三)对实验动物微生物控制的选择

1. 实验动物的选择 按微生物控制分类,实验动物分为四级,见表1-2。对于毒性试验及毒理学研究应使用二级(或二级以上)的动物,以保证实验结果的可靠性。

(1)普通动物(conventional animal,CVA):是实验动物中在微生物控制上要求最低的动物。饲养在开放系统的动物室内。空气未净化,饲喂全价颗粒饲料,可饮自来水。房舍要求有防鼠和防止昆虫入内的设施。人员进入要穿工作服、专用鞋帽。

(2)悉生动物(gnotobiotic animal,GNA):又称清洁动物。饲养在屏障系统中,空气要经过净化,饲养室要保持正压,进入室内的一切物品要经过消毒灭菌,工作人员进入要洗澡和穿灭菌工作服,动物饮灭菌水。

表 1 2 实验动物微生物等级标准

等级		饲养环境	要 求
Ⅰ级	普通动物	开放系统	应没有传染给人的疾病
Ⅱ级	悉生动物	屏障系统	除Ⅰ级标准外，种系清楚，没有该动物特有的疾病
Ⅲ级	无特定病原体动物(SPF)	屏障或隔离系统	除Ⅰ级标准外，动物为剖腹产或子宫切除产，按纯系要求繁殖，在隔离器内或层流室内饲养，可有不致病细菌丛，没有致病病原体
Ⅳ级	无菌动物	隔离系统	在全封闭无菌条件下饲养的纯系动物，动物体外不带有任何微生物和寄生虫(包括绝大部分病毒)

(3)无特定病原体动物(specific pathogen free animal,SPF)：饲育在屏障或隔离系统中，是通过无菌动物、悉生动物、SPF动物获得的。笼具、饲料饮水要经过特殊处理，并有严格的检疫、消毒、隔离制度。

(4)无菌动物(germ free animal,GFA)：此种动物在自然界中并不存在，是在隔离器中经人工剖宫产取得仔体，用无菌母体代乳或人工哺乳，经净化培育得到。

2. 实验动物设施的分类

(1)开放系统(open system)：饲育环境与外界相同，有强力通风设施、饲料、饮水和垫料要求不被污染，应防鼠和防昆虫措施。

(2)屏蔽系统(barrier system)洁净度万级：饲育环境是密闭的。送入的空气需经过滤，洁净度达万级，饲料、饮水和垫料要需经灭菌，饲养人员进入要经过淋浴、穿无菌工作服、戴口罩、手套。

(3)隔离系统(isolation system)洁净度百级：是以一个隔离器(isolator)为主体及其客观存在附属装置组成的饲养系统，送入的全新风要经百级以上洁净度过滤，一切物品都有要经严格灭菌后经传递仓送入，饲养人员不得入内。

(四) 个体选择

实验动物对外来化学物的毒性反应还存在个体差异，应注意实验动物的个体选择。

1. 性别　同一物种、同一品系的实验动物雌雄两性通常对相同外源化学物毒性反应类似，但雌雄两性对化学物的毒性敏感性上存在着差别。一般来说，对于初次试验的受试物，应该采用两种性别。如实验中发现存在性别差异，则应将不同性别动物的实验结果分别统计分析。如果已知不同性别的动物对受试物敏感性不同，应选择敏感的性别。

2. 年龄和体重　毒理学试验选用实验动物的年龄取决于试验的类型。急性试验一般选用成年动物；慢性试验因实验周期长，应选用较年幼的或初断乳的动物，以使实验周期能覆盖成年期。实验动物的年龄应由其出生日期来定，但实际工作中常以动物的体重粗略地判断动物的年龄，作为挑选适龄动物的依据。同一试验中，组内个体间体重差异应小于10%，各组间平均体重差异不应超过5%。

3. 生理状态　在毒理学试验中动物如出现妊娠，则影响体重及其他指标的检测结果，并且性激素对外源化学物代谢转化有影响，故应选用未产未孕的雌性动物。雌雄动物应分笼饲养。但在某些试验如显性致死试验、致畸试验及繁殖试验等，则需有计划地合笼

交配。

4. 健康状况 实验动物的健康状态对毒理学试验结果有很大的影响，因此应选用健康动物。上述对于实验动物微生物控制的选择实际上是选择健康状况的一个重要指标，健康个体的选择还包括了其他方面。健康动物应发育正常、体形健壮、无外观畸形，被毛浓密、有光泽、顺贴而不蓬乱、行动灵活、反应敏捷、眼睛明亮有神、表皮无溃疡和结痂，天然孔道干净无分泌物等。

为确保选择健康动物，一般在实验前观察5～7天。对于大鼠和犬的亚慢性和慢性试验，可在实验前采血进行血液学和血液生化学检查，异常的动物应剔除；对犬应常规驱除肠道寄生虫。

（五）实验动物的管理

我国实验动物的政府管理机构是在国家科技部和省（市）、自治区科技厅领导下的各行业或系统、各行政区域、各单位的实验动物管理委员会。自1988年国务院批准《实验动物管理条例》以来，发布了多项国家和地方法规，并制定了有关的国家标准，其中强制性国标为《GB14922-2001 实验动物微生物学和寄生虫学监测等级（啮齿类和兔类）》、《GB14923-2001 实验动物哺乳类动物的遗传质量控制》、《GB14924-2001 实验动物全价营养饲料》、《GB14925-2001 实验动物环境及设施》。在毒理学实验中所用的实验动物应有动物合格证、实验动物生产许可证、饲料合格证、实验动物使用许可证等。进行动物实验的人员应经培训，取得资格认可（上岗证）。

对实验动物的管理应遵循上述的法规和标准，特别注意：

1. 动物的管理 动物的健康、动物的接收、适应、饲养、鉴别和记录。对所有实验动物都须记录每只或每群动物的来源、处理以及其他有关资料。

2. 环境条件的控制 气候（温度、湿度、通风、光照），其他条件（噪音、气味、垫料、群体密度和空间限制）、饲料、饮水、运动等。

3. 设施的管理 清洁卫生、废弃物处理、害虫控制、节假日和突发事件的管理。

第五节 实验动物的准备

（一）动物实验前的准备

实验动物在购进之后，应雌雄分开饲养。一般应进行5～7天的检疫，在此期间应多次观察动物，及时剔除不健康的动物。观察期结束，将实验动物按实验设计的要求进行标记和分组。

实验动物分组的原则要求所有的动物分配到各剂量组和对照组的机会均等，避免主观选择倾向，减少偏性，以保证结果的准确可靠。正确的分组方法是随机分组。实验动物按性别、体重顺序编号，然后利用统计学的随机数字表，按完全随机分组法或配伍组随机分组法，将实验动物分配到各剂量组和对照组。然后应计算各组实验动物体重的均值和标准差，必要时可将实验动物适当调组，以使各组实验动物体重的均值的差别不超过允许范围。

常用实验动物性别鉴别：对小鼠和大鼠，最简单的方法是看性器官与肛门的距离。雌鼠的性器官与肛门间距离极短，界限不清。成年雌鼠有明显可见的乳头。雄鼠的性器官

与肛门间距离较长，两者间有毛。成年雄鼠可见睾丸。家兔：兔呈仰卧位，自尾向前观察，肛门位于尾的基部之下，肛门前有一个泄殖孔。成年雄兔可见两睾丸。而雌兔在肛门前面有两个相距极近的孔分别为尿道口和阴道口。成年雌兔有五对乳头。

（二）实验动物的抓取和固定方法

正确地抓取和固定动物，是为了不损害动物，不影响观察指标，并防止被动物咬伤，保证实验顺利进行。抓取固定动物的方法依实验内容和动物种类而定。抓取固定动物前，必须对各种动物的一般习性有所了解，抓取固定时既要大胆敏捷，又要小心仔细，不能粗暴。

1. 小鼠的抓取固定方法　小鼠的抓取法有两种：一种是用右手提起尾部，放在鼠笼盖或其他粗糙面上，向后上方轻拉，此时小鼠前肢紧紧抓住粗糙面，迅速用左手拇指和示指捏住小鼠颈背部皮肤并用小指和手掌尺侧夹持其尾根部固定手中；另一种抓法是只用左手，先用拇指和示指抓住小鼠尾部，再用手掌尺侧及小指夹住尾根，然后用拇指及示指捏住其颈部皮肤（图 1-1）。小鼠的固定可用固定器方法（图 1-3）。

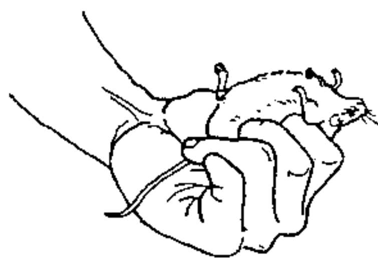


图 1-1　小鼠的抓取

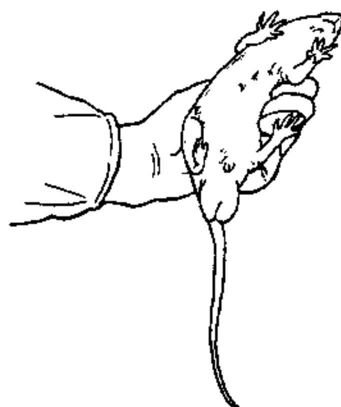


图 1-2　大鼠的抓取

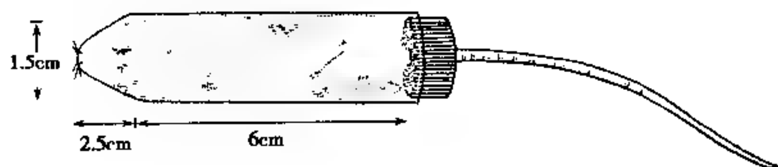


图 1-3　小鼠固定

2. 大鼠的抓取固定方法　抓大鼠时若操作不熟练者，最好戴上防护手套（帆布或硬皮质均可）。如是灌胃、腹腔注射、肌肉和皮下注射，可采用与小鼠相同的手法，即用拇、示指捏住鼠耳头颈皮肤，余下三指紧捏住背部皮肤，置于掌心中，调整大鼠在手中的姿势后即可操作（图 1-2）。大鼠的固定可用固定器方法（图 1-4）。

大鼠手术操作应对大鼠进行麻醉和固定。麻醉的大鼠可置于大鼠实验板上（仰卧

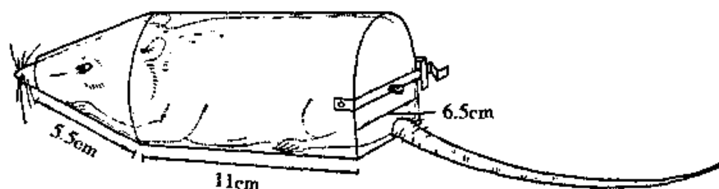


图 1 4 大鼠固定



图 1 5 兔的抓取

位),用橡皮筋固定好四肢(也可用棉线),为防止苏醒时咬伤人和便于颈、胸部实验操作,应用棉线将大鼠两上门齿固定于实验板上。大鼠静脉注射的固定器见图 1 4。

3. 兔的抓取固定方法

兔的抓取 一般以右手抓住兔颈部的毛皮提起,然后左手托其臀部或腹部,让其体重重量的大部分集中在左手上(图 1 5),这样可避免抓取过程中的动物损伤。不应采用抓双耳或抓提胯部的方法。

兔的固定 分为盒式、台式两种。盒式固定适用于兔耳采血、耳血管注射等情况;若做血压测量、呼吸等实验和手术时,则需将兔固定在兔台上,四肢用粗棉绳活结绑住,拉直四肢,将绳绑在兔台四周的固定木块上,头以固定夹固定。

(三)实验动物的编号标记

对各种实验动物的标记方法如下:①小鼠:剪趾(胎鼠 新生鼠)、耳打孔、刺纹、植入;②大鼠:剪趾(胎鼠 新生鼠)、耳打孔、刺纹、耳标记、植入;③豚鼠:耳打孔、耳标记、刺纹、植入;④兔:耳标记、刺纹、植入;⑤犬和猴:刺纹、项圈、植入。对啮齿动物或白色家兔等的标记常用染色法,可用苦味酸(黄色)、品红(红色)的酒精饱和溶液在动物不同部位被毛上染色标记。如给小鼠或大鼠标记 1～10 号,可将小鼠或大鼠从头顶 1 号、右前肢 2 号、右腰 3 号、右后肢 4 号、尾根 5 号、左后肢 6 号、左腰 7 号、左前肢 8、背中 9 号的顺序标记1～9 号,第 10 号不作标记(图 1-6)。用一种颜色可编 46 个鼠(1～89 号,不染色为 10 号,染两处按低号计。如 3 号和 4 号两处染色,应为 34,不是 43。弃去个位号与十位号重复的号,如尤 11、22、99 号等)。如用红色表示十位数黄色表示个位数,可标出 1～99 号。由于被毛上颜色会逐步消失,故需重复染色。耳缘孔口标记法见图 1 7。

(四)实验动物随机分组

实验动物分配到各实验组和对照组必须遵循随机的原则,以保证实验中非处理因素均衡一致。按性别,将动物称体重、编号,再按体重从大到小排序,可利用《卫生统计学》中

提供的随机数字表或随机排列表进行随机分组。限于篇幅，在此不赘述。

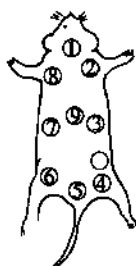


图1-6　啮齿动物染色标记法

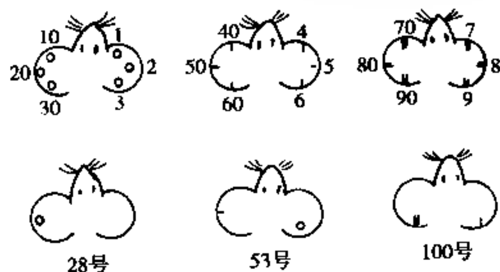


图1-7　耳缘孔口标记法

为日常工作需要，作者自编了分成4组(3个剂量组和1个阴性对照组)或5组(3个剂量组、阴性对照组和阳性对照组各1个)的配伍组随机分组表，见表1-3。配伍组随机分组法应按性别，将动物称体重、编号，再按体重从大到小排序，以分4组(分别为ABCD)为例，将动物按体重顺序4个为1区组。在下表分4组列中任指定1行开始，依次标于各配伍区组的动物编号下。如第5行，第1区组4个动物分别分到ACBD，以下区组则为DBCA、CABD、BDAC等。各动物据此分配到4组。分组后，再统计各组动物体重的均数，必要时在组间进行调整。

表1-3　配伍组随机分组表

分4组		分5组					
			1	2	3	4	5
1	BCAD	1	DEBCA	ECDBA	CAEBD	BECDA	ACDBE
2	DACB	2	ECBDA	ACEBD	DEACB	CDAEB	BACBE
3	ACDB	3	CDEAB	BAFBC	FBDCA	DCEBA	ABDEC
4	CBAD	4	ACBDE	DCBEA	BCDEA	CEBAD	EBDAC
5	ACBD	5	BEDAC	CBAED	AECBD	EACDB	DBCEA
6	DBCA	6	ECBAD	CBEDA	BEDCA	DBECA	ABEDC
7	CABD	7	DBACE	EDBAC	AEDCB	BCAED	CBEAD
8	BDAC	8	CDABE	ABCDE	FBCAD	DABCE	BDCEB
9	CADB	9	ACDEB	BEADC	DABEC	EDCAB	CDBEA
10	ADBC	10	BDCBA	DBEAC	CEBDA	ADBEC	EBCDA
11	BACB	11	CADEB	DCAEB	EACBD	BEACD	ACEDB
12	DBAC	12	DCBAE	CADBE	ADBCE	EABDC	BCEDA
13	BABC	13	ECADB	BDCAE	CABDE	ADECB	DBCAE
14	ADCB	14	ADCBE	ECDAB	DECBA	CBDAE	BAECB
15	DCBA	15	BCDAE	ADCEB	DACBE	EDBCA	CEDAB

续表

分4组		分5组	1	2	3	4	5
16	CDBA	16	DCABE	BECAD	ECABD	AECDB	CABED
17	BDCB	17	BDACE	BDEAC	AEBCD	DACEB	CEABD
18	ABDC	18	EADBC	CEADB	BCADE	ABECD	DAECB
19	DCAB	19	CDEBA	ABCED	EDACB	DBAEC	BADEC
20	CDAB	20	ABDCE	DEBAC	DABCE	EBACD	CAEDB
21	ABCD	21	EABCD	DECAB	ADEBC	BDECA	CBDEA
22	BCDA	22	AEDBC	BDAEC	DCEAB	CEDBA	EDABC
23	CBDA	23	BACED	ACBED	DAEBC	EADCB	CBADE
24	DABC	24	CDBAE	EBADC	BCEAD	AEBDC	DEABC

第六节 受试物和样品的准备

应了解受试物的纯度及杂质成分，了解受试物的化学结构和理化性质，特别是其挥发性（熔点、沸点）、溶解性、pH、稳定性（包括受试物在赋形剂中的稳定性）。查阅文献，检索与受试物化学结构和理化性质相似的化合物的毒性资料，以作参考。对各个毒理学试验应该用同一种、同一批号受试物。受试物成分和配方必须固定。如是异构体混合物，异构体比例必须固定。活性成分的百分比和可检测的杂质的浓度也应固定。受试物在贮存期内稳定性和在饲料中的稳定性必须进行研究并报告。受试物应一次备齐全部实验的用量。

$$所需受试物总量=(A\times B\times C\times D)\times 1.2$$

式中：A为每组动物数；B为各处理组的剂量和（如0.1+0.3+1.0=1.4mg/kg）；C为染毒次数（通常为天）；D为动物的平均体重；1.2为安全因子，包含损耗量。

染毒前根据染毒途径的不同，应将受试物制备成一定的剂型。常用的是制备成水溶液、油溶液或混悬液。对溶剂和助溶剂的要求是：①所用的溶剂或助溶剂应该是无毒或实际无毒；②与受试物不起反应，受试物在溶液中应稳定；③对受试物的毒动学和毒效学无显著影响；④无特殊刺激性或气味。对水溶性受试物，体内试验首选的溶剂为水（经口染毒）和等渗盐水（胃肠道外染毒）。水不溶性受试物应溶于或悬浮于适当的有机溶剂中。天然植物油（如玉米油，橄榄油），可以用作为溶剂，但有两个缺点，即不可能保证得到成分完全一致的植物油，植物油中的抗氧化剂成分等可影响受试物的毒性/遗传毒性。混悬液最常用的赋形剂为0.5%羧甲基纤维素钠或10%阿拉伯树胶。受试物溶液应新鲜配制，除非已证明贮存稳定。

美国药剂协会（1986）推荐的常用溶剂和赋型剂如下。

1. 丙酮（acetone） 大鼠经口LD_{50}为10.7ml/kg，重复用于皮肤可脱脂。用于皮肤和

经口，经口限量为5ml/kg。

2. 羧甲基纤维素(carboxyl methyl cellulose，CMC) 惰性。0.1%～5%水溶液，用于经口。

3. 玉米油(corn oil) 用于经口、皮肤、阴道、直肠、皮下。

4. 二甲基甲酰胺(N，N dimethylformamide，DMFO) 大鼠经口 LD_{50} 为7.6ml/kg，对原代细胞无细胞毒性。用于经口、皮肤、腹腔和静脉(浓度最高为1%)。

5. 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide，DMSO) 大鼠经口 LD_{50} 为17.9ml/kg，小鼠腹腔注射 LD_{50} 11.6ml/kg。重复用于皮肤可脱脂，对原代细胞无细胞毒性。用于所有的途径，浓度达5%可增强吸收。

6. 乙醇(ethanol) 大鼠经口 LD_{50} 为7.6ml/kg，小鼠静脉注射 LD_{50} 为11.6ml/kg。用于皮肤和经口，低浓度可用于其他途径。经口限量为5 ml/kg。

7. 甘油(glycerol)，丙二醇 大鼠经口 LD_{50} 为20ml/kg。用于经口、皮肤、腹腔和静脉(其水溶液)。

8. 阿拉伯胶(gum Arabic) 惰性。经口，作为稀释或增粘剂。

9. 乳糖(lactose) 经口，作为稀释剂，以降低刺激性。

10. 甲基纤维素(methyl cellulose) 惰性。0.1%～5%水溶液，用于经口。

11. 甲基乙基酮，丁酮(methyl ethyl ketone，MEK) 大鼠经口 LD_{50} 为6.86ml/kg，重复用于皮肤可脱脂。用于皮肤。

12. 凡士林油(mineral oil；liquid petrolatum) 经口、阴道、直肠、皮肤，用作悬浮剂。

13. 橄榄油(olive oil) 经口。

14. 花生油(peanut oil Arachis oil) 经口、皮肤、阴道、直肠、皮下和肌内注射。

15. 凡士林(petrolatum Vaseline petroleum Jelly) 惰性。用于皮肤、阴道、直肠。

16. 聚乙二醇-400(polyethylene Glycol 400，PEG400) 小鼠经口 LD_{50} 为23.7ml/kg，大鼠经口 LD_{50} 为30ml/kg。用于经口，作助溶剂。

17. 生理盐水(saline) 除皮肤和眼周外，所有的途径。

18. 吐温80(Tween 80) 用于经口，作助溶剂。

19. 水 所有的途径，首选。

在准备染毒制剂时的要点：①在准备制剂时加热受试物不应接近改变其化学性质或物理性质的温度。②如受试物为固体，并且评价其对皮肤的毒性，应保持其形状和颗粒大小。③多成分的受试物(混合物)应按配方配制，以使染毒制剂准确地反映原混合物(即其成分不应被选择性地悬浮或溶解)。④制剂应保持化学稳定性和受试物的一致性。⑤制剂应减少总试验容积，利用溶剂或赋形剂的量不应过多。⑥制剂应易于准确染毒。⑦如可能，制剂pH应为5～9。⑧不应用酸或碱使受试物解离(基于保护动物的原因，并避免改变肠道或肾小管内的pH)。⑨如果应用非胃肠道途径，终溶液应尽可能接近等渗。

第七节 实验动物染毒途径和技术

在毒理学试验中染毒途径的选择，应尽可能模拟人在接触该受试物的方式。最常用的染毒途径为经口、经呼吸道、经皮及注射途径。染毒的途径和方法根据实验目的、实验

动物种类和药物剂型等情况确定。不同途径的吸收速率，一般是静脉注射→吸入→肌内注射→腹腔注射→皮下注射→经口→皮内注射→其他途径(如经皮等)。

(一) 经口(胃肠道)染毒

常用有喂饲、灌胃和吞咽胶囊等方式。

1. 喂饲　将受试物掺入动物饲料或饮水中供实验动物自行摄入。如果受试物是完全无毒的，则在饲料中的最高含量可为5%，一些有营养价值的食物成分物质则可更高，但应注意不要造成饲料营养成分失衡而影响实验动物的生长发育。喂饲法符合人类接触受试物的实际情况，但缺点多，如适口性差的受试物，实验动物拒食；易挥发或易水解的受试物不适用。而且，实验动物应单笼喂饲，以食物消耗量计算其实际染毒剂量。

2. 灌胃　将受试物配制成溶液或混悬液，以注射器经导管注入胃内。一般灌胃深度从口至剑突下。最好是利用等容量灌胃法，即受试物配制成不同浓度，实验动物单位体重的灌胃容量相同。外源化学物用溶剂稀释，一般讲浓溶液比稀溶液毒性大，但是也有的外源化学物稀释之后毒性反而增加，即存在所谓"稀释毒性"，其原因尚不清楚。因此在发现有稀释毒性时等浓度灌胃法也可接受。灌胃前应禁食空腹，大鼠隔夜禁食，小鼠可禁食4h(因小鼠消化吸收和代谢速度较快)，均不停饮水。灌胃后2～4h提供饲料。经口多次染毒，一般不禁食，但应每日定时染毒。灌胃法适用小鼠、大鼠、兔、犬等动物，优点是剂量准确，缺点是工作量大，并有伤及食管或误入气管的可能。

(1)小鼠灌胃法：左手拇指和示指捏住小鼠头部两耳后皮肤，无名指或小指将尾部紧压在手上，使小鼠腹部向上。右手持灌胃管(1～2ml注射器上连接以14号注射针头，尖端磨钝，稍加弯曲的灌胃管)，灌胃管长4～5cm，直径约1mm。操作时，经口角将灌胃管插入口腔，用胃管轻压小鼠头部，使口腔和食管成一直线，再将胃管沿上腭壁轻轻插入食管内，当推进约2～3cm左右时，灌胃管前端约到达膈肌水平(体重20g左右的小鼠)，此时可稍感有抵抗。如此时动物无呼吸异常，即可将药注入。如遇阻力或动物憋气则应抽出重插管。如误插入气管注药时可引起动物立即死亡。药液注完后轻轻退出胃管。操作时宜轻柔，以防损伤食管及膈肌。

(2)大鼠灌胃法：灌胃法与小鼠相似。采用的灌胃管长约6～8cm，直径约为1.2mm，尖端磨钝。插管时，为防止插入气管，应先抽回注射器针栓，无空气抽回说明不在气管内，即可注药。

(3)犬和家兔灌胃法：由2人操作，将犬关入特制犬笼，并移动活动栅，挤犬并使之固定，持犬者两手握住犬耳后及颈部皮肤，使犬头部朝上颈部拉直。灌胃者用一木棍让犬咬住，将硬质胃管自木棍与上腭之间插入食管，约20cm左右即下达到胃腔(插入深度可预先在体外测量好，并做好记号)。持兔者端坐两腿夹住兔躯干及其后肢，两手握住兔耳及前肢，将兔头朝上，使兔颈部拉直。灌胃者用开口器通过兔口角(在犬齿后)之空隙，将开口器向下转动数次，使兔舌伸出。开口器的孔应放置在口腔正中央，将硬质胃管通过开口器小孔插入食管，约10～15cm左右即下达到胃腔。如胃管进入胃内，动物较安静，无挣扎、气促等表现，应先抽回注射器针栓，无空气抽回说明不在气管内，即可用注射器推入药液，再推入2～3ml水，以送入留滞在胃管内的药液，灌胃完毕，迅速抽出胃管，然后取出木棍或开口器。

3. 吞咽胶囊　将一定剂量的受试物装入胶囊中，放至犬的舌后部，迫使动物咽下，此

法剂量准确，适用于易挥发、易水解和有异味的受试物。

(二) 经呼吸道染毒

经呼吸道染毒可分为吸入染毒和气管内注入。

1. 静式吸入染毒　将一定数量的啮齿类动物放在密闭的染毒柜中，加入易挥发的液态受试物或气态受试物使成一定浓度。静式吸入染毒简易，但缺点较多，主要是随试验进行氧分压降低(因此，实验动物数量有限制)，柜内受试物浓度也逐渐下降(由于动物吸入消耗、为被毛及染毒柜壁吸附所致)，而且实验动物有经皮吸收的可能。染毒时间一般为2h。要求受试物在10min内蒸发完毕。

柜顶盖部有三个附件。一个是投药孔，在孔下方用多层纱布或滤纸作为接受和蒸发液态受试物的药物蒸发器；一个是用于混匀蒸气或气体的小电扇；一个是插入温度计的孔。在柜的下部的1/4处还留有一个供采样的孔。

静式吸入染毒时应根据染毒柜容积和染毒时间，确定放置的实验动物数，以保证动物的最低需气量(表1-4)。染毒柜所需容积也可按实验动物总体重(kg)×100×染毒时间(h)来估算，相当于动物每kg体重每小时所需空气体积为100L。

静式吸入染毒多以计算方法得到染毒柜内受试物浓度，受试物浓度以 mg/m^3 表示，易挥发液体化学物计算公式为

$$C=(a\cdot d\cdot 1000)/L$$

式中：C—设计的染毒浓度(mg/L)；a—加入受试物的量(ml)；d—受试物的比重(g/ml)；L—染毒柜容积(L)。

气态化学物加入为ml数，可依据染毒柜容积折算为ppm。单位 mg/m^3 与ppm的换算公式为(式中MW为受试物的分子量)：$mg/m^3=(MW\cdot ppm)/22.4$

可在染毒期内测定受试物浓度2～3次，以其均值作为实际染毒浓度。

表1-4　实验动物的最低需气量及不同染毒柜容积应放置的动物数(染毒2h)

实验动物	呼吸量(L/h)	最低需氧量(L/h)	静式染毒2h可放动物数				
			25L	50L	100L	300L	1000L
小鼠	1.45	4.50	3～5	6～10	12～15	36～40	120～150
大鼠	10.18	30.54	0	1	1～2	5～6	16～18
豚鼠	10.18	30.54	0	1	1～2	5～6	16～18
猫	19.30	57.90	0	0	0	3～4	9～10
家兔	42.25	126.80	0	0	0	1	4～5
猴	51.60	154.80	0	0	0	1	3～4
狗	312.60	97.80	0	0	0	0	1

实验步骤：

(1)将动物放入染毒柜(亦可连动物笼一起放入染毒柜)。

(2)将染毒柜密闭好。

(3)从投药孔将所需受试物加到药物蒸发器上，随即塞好投药孔并开始计算染毒时

间。同时开放电扇加速液体蒸发。气态受试物可用大注射器抽取受试气体从投药孔注入。

(4)观察实验动物的症状、死亡时间，并仔细记录。

(5)染毒结束后，关闭电源，打开门(盖)，驱出柜内残存有毒空气，取出动物，存活者归笼继续观察。

(6)冲洗染毒柜，将动物排泄物冲干净，擦干染毒柜备用。

2. 动式吸入染毒　动式吸入染毒设备由染毒柜、机械通风系统和配气系统三部分构成(图1-8)。对设备的要求较高，优点是在染毒过程中染毒柜内氧分压及受试物浓度较稳定，缺点是消耗受试物的量大，并易于污染环境。动式吸入染毒又分为整体接触和口鼻接触两种，示意图见图1-9。

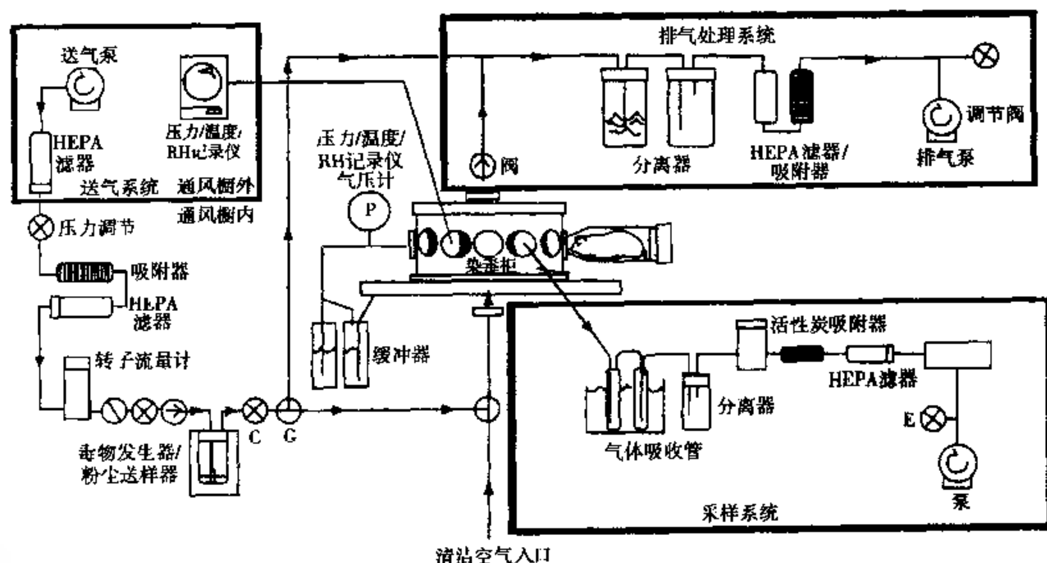


图1-8　动式吸入染毒设备

此设备设计为维持每小时12～15次的换气，保证氧气浓度为19%和受试物的均匀分布。染毒柜应维持成轻微的负压以免受试物从染毒柜逸出。要保证染毒柜中气流的稳定性，实验动物的总体积不能超过染毒柜容积的5%。如采用鼻口或头部暴露吸入染毒法，可避免经口和皮肤同时接触受试物。应使用适当的浓度控制系统。应调整空气流速，以保证整个设备的条件一致。

在染毒柜中受试物浓度达平衡后，每天的染毒时间应为6h。在必要时，也可利用其他的暴露时间。从实际考虑，每周染毒5天是可接受的。

进行试验时温度应维持在(22±2)℃。相对湿度最好保持40%～60%之间(但不适用于气溶胶试验)。染毒过程中，停止供食和供水。

在进行下述的测量或监测时，应尽可能地使维持恒定：①气流速度，每次暴露应监测≥3次。②受试物的实际浓度和气溶胶浓度粒度分析，每次暴露应监测2～4次。③连续监测温度，每30min记录一次。

3. 气管内注入：此法用于建立急性中毒模型及尘肺研究。以大鼠为例，用乙醚轻度

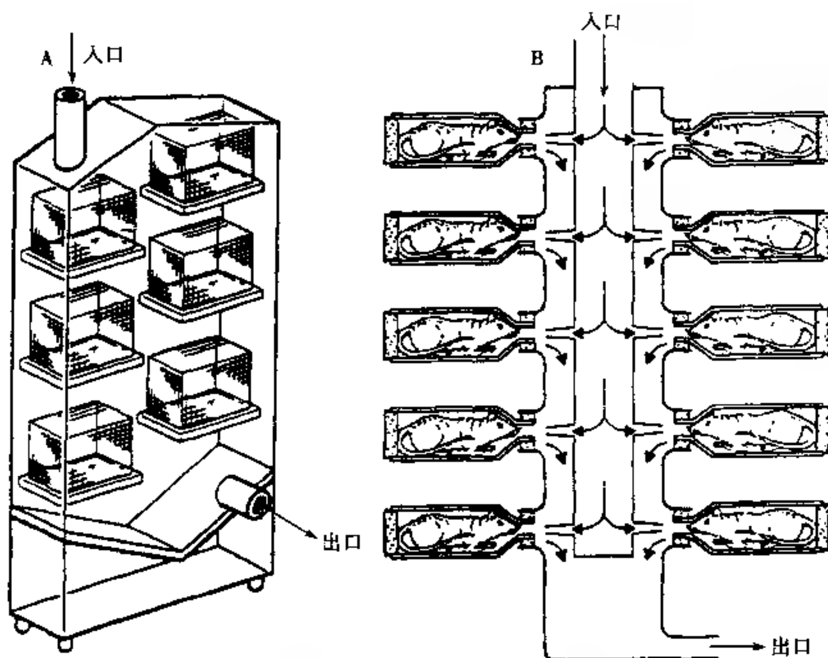


图 1-9 动物染毒柜模式图
A 整体暴露 B. 口鼻暴露

麻醉大鼠(侧卧即可),将麻醉的大鼠用线套住其门齿,挂在染尘架上,鼠背向操作者。用无齿镊夹住并拉出舌头,用小块纱布包裹舌头,用左手拉住。右手取耳镜放入大鼠口腔,暴露气管开口。使光线照射于耳镜,可见随呼吸时张时闭的V形白环(声带)。术者左手松开大鼠舌头并固定耳镜,右手接过助手传递的钝头穿刺针,待V形口张开时把针头插入气管约1~1.5cm,此时针头已达气管的上中段。助手将吸好注射液的注射器接在穿刺针上,回抽如有气泡,证明位于气管内,即可将受试液注入气管内。术前所有用具和受试液均应消毒,必要时可在受试液中加青霉素2000IU/ml。

(三)经皮肤染毒

经皮肤染毒的目的有两种。一种是经皮染毒毒性试验,如经皮 LD_{50} 测定常用大鼠,皮肤致癌试验常用小鼠。另一种是皮肤刺激和致敏试验,皮肤刺激试验常用兔和豚鼠,皮肤致敏试验用豚鼠。

被毛的去除:试验前用机械法(剪剃毛)或化学法(硫化钠或硫化钡)脱毛。对兔和啮齿类常用的脱毛剂处方为:①硫化钠8g溶于100ml水中;②硫化钠3份、洗衣粉1份、淀粉7份加水调成糊状。用脱毛剂前,先剪去脱毛部位的被毛,注意不可用水浸湿被毛,以防止脱毛剂顺被毛到达毛根深部损伤皮肤。用镊子夹棉球或纱布团蘸脱毛剂涂抹在已剪去被毛的部位,3~5min后用温水洗去脱下的毛和脱毛剂。

脱毛的要求是不应损伤脱毛区的表皮,脱毛区面积不大于动物体表面积的10%。于脱毛后24h涂抹一定量受试物,盖上2~4层纱布和一层玻璃纸或塑料薄膜,再用无刺激性的胶布固定,接触规定的时间。如要求重复接触受试化学物,一般间隔1周再剪剃毛1次。

(四)注射染毒

注射用药品,应以注射途径染毒,对非啮齿类可模拟人拟用注射途径,而啮齿类的尾静脉和肌内注射难以多次染毒,必要时可改为皮下注射或腹腔注射。注射染毒,应调整受试物的 pH 及渗透压,pH 应为 5～8,最好是等渗溶液,动物对高渗的耐受力比低渗强。静脉注射应控制速度,大鼠尾静脉注射最好控制在 10 秒以上。腹腔注射在遗传毒理学实验中有时也用,但在致畸试验、肝 UDS 研究不应该用腹腔注射,为避免可能的损伤和局部高浓度对靶器官的影响。此外,在注射前应注意局部消毒。

1. 皮下注射(SC) 注射时以左手拇指和示指提起皮肤,将连有针头的注射器刺入皮下。皮下注射部位一般犬、猫多在大腿外侧;豚鼠在大腿内侧或小腹部;大鼠可在下腹部。兔在背部或耳根部注射。

2. 皮内注射(ID) 皮内注射时需将注射的局部脱去被毛,消毒后,用左手拇指和食指按住皮肤并使之绷紧,在两指之间,用结核菌素注射器连细针头,紧贴皮肤表层刺入皮内,然后再向上挑起并再稍刺入,即可注射药液,此时可见皮肤表面鼓起一白色小皮丘。

3. 肌内注射(IM) 肌内注射应选肌肉发达,无大血管通过的部位,一般多选臀部。注射时垂直迅速刺入肌肉,回抽针栓如无回血,即可进行注射。给小鼠、大鼠等小动物作肌内注射时,用左手抓住鼠两耳和头部皮肤,右手取连有针头的注射器,将针头刺入大腿外侧肌肉,将药液注入。

4. 腹腔注射(IP) 大、小鼠腹腔注射时,以左手抓住动物,使腹部向上,右手将注射针头于左(或右)下腹部刺入皮下,使针头向前推约 1.5cm,再以 45°角穿过腹肌,固定针头,缓缓注入药液,为避免伤及内脏,可使动物处于头低位,使内脏移向上腹。若实验动物为家兔,进针部位为下腹部的腹白线旁开 1cm 处。

5. 静脉注射(IV)

(1)小鼠和大鼠:一般采用尾静脉注射,鼠尾静脉有 3 根,左右两侧及背侧各一根,左右两侧尾静脉比较容易固定,多采用。操作时先将动物固定在鼠筒内,使尾巴露出,尾部用 45℃～50℃ 的温水浸润半分钟或用酒精擦拭使血管扩张,并可使表皮角质软化,以左手拇指和示指捏住鼠尾两侧,使静脉充盈,用中指从下面托起尾巴,以无名指和小指夹住尾巴的末梢,右手持注射器连号细针头,使针头与静脉平行(小于 30°),从距尾尖 2～3cm 处进针,此处皮薄易于刺入,先抽回血,再缓注少量药液,如无阻力,表示针头已进入静脉,可继续注入。注射完毕后棉球压迫止血或把尾部向注射侧弯曲以止血。如需反复注射,应尽可能从末端开始,以后向尾根部方向移动注射。在毒物动力学研究中大鼠在麻醉后还可采用舌下静脉注射。

(2)兔:兔耳部血管分布清晰。兔耳中央为动脉,耳外缘为静脉。内缘静脉深不易固定,故不用。外缘静脉表浅易固定,常用。先拔去注射部位的被毛,用手指弹动或轻揉兔耳,使静脉充盈,左手示指和中指夹住静脉的近端,拇指绷紧静脉的远端,无名指及小指垫在下面,右手持注射器连 6 号针头尽量从静脉的远端刺入,移动拇指于针头上以固定针头,放开示指和中指,将药液注入,然后拔出针头,用手压迫针眼片刻。

(3)犬:静脉注射用前肢内侧面皮下的头静脉、后肢胫部下 1/3 的外侧皮下的小隐静脉,可多次重复注射或静脉滴注。

(五)染毒途径

对于各种染毒途径的最大容积，以受试的实验动物物种或制剂来确定。一般推荐，染毒最大容积为：①经口 20ml/kg(对空腹动物)；②经皮 2ml/kg(根据体表面积计算，限于染毒的准确性)；③静脉 1ml/kg(5min 以上)；④肌内注射 0.5ml/kg(一个部位)；⑤每眼 0.01ml；⑥直肠 0.5ml/kg；⑦阴道：大鼠 0.2ml，兔 1ml；⑧吸入 2mg/L；⑨鼻：猴或犬每鼻孔 0.1ml。

英国药业会推荐的最大给药/染毒容量见下表(表1-5)

表1-5 推荐的最大给药/染毒容量(ml/kg) (英国药业会，1995)

物种	灌胃	静脉注射	腹腔注射	肌肉注射	皮下注射	皮内注射
小鼠	2[illegible]	10	2	[illegible]5 只	20	0.5
大鼠	20	5	10	0.1 只	5	0.5
豚鼠	2[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]1 只	[illegible]	0.[illegible]
兔	10	2	4	0.25	1	0.5
犬	10	[illegible]	[illegible]	0.25	1	0.5
灵长类	1[illegible]15	2~2.[illegible]		[illegible]	2	0.5

第八节 实验动物生物标本采集及处死

(一) 生物标本采集

1. 血液采集 终末和非终末采血技术(如麻醉、取血体积)是有区别的，在以动物死亡为实验结束(终末实验)时的情况下采血与在清醒动物身上单次或多次采血的情况是迥然不同的。

在实验过程中减少动物的疼痛与不安和获得预期实验结果一样重要。这不仅是出于人道主义，而且也是良好科学实践所要求的内容。因某一特定采血技术的动用和由此给动物带来的不安可能会使动物产生应激，而伴随应激反应出现的许多生化和生理改变会影响实验结果，如血中儿茶酚胺类、催乳素和糖皮质激素的升高会影响葡萄糖、红细胞数、白细胞数和细胞压积等一些代谢参数。所以如果不能完全排除应激，那么也应将应激降至最小程度。这不只是为动物考虑，也是为获得有代表性数据的良好科学实验所需。

在非终末采血中，不要抽血太多，因为取血过多会减少总血量而导致错误结果。总血量的减少会伴随血红蛋白含量、氧转运能力和血压的下降及应激相关激素浓度的升高，也可能进一步产生其他变化，如胃粘膜坏死等。

血液总量取决于物种、性别、年龄、健康及营养状况。对于同一种物种，较大动物单位体重的总血量比较小的动物要少，老龄和肥胖动物比年轻和正常体重的动物单位体重含总血量少。一般情况下，总循环血量为 55～77ml/kg 体重。

非终末采血可分为单次和多次采血，单次采血量低于动物总血量的 15%，对动物不会有影响。然而，若取量为总血量的 15%～20%，则会出现一些副作用，如心排血量或血压降低。如果取总血量的 30%～40%则会引起缺血性休克，若取血达 40%可引起约 50%的猪和大鼠死亡。

对健康的没有明显不良反应的动物，单次采血不超过动物总血量的15%，可在3～4周后重复采血。多次采血每24h不应超过总血量的1%[.6 ml (kg·d)]。若采集次数和(或)采血量过多则引起贫血。

对大、小鼠采取不超过 .1ml的毛细管中血液常用尾尖采血法。眼眶静脉丛穿刺通常适用于无尾动物如仓鼠。当尾静脉不能满足较大的采血量时，大、小鼠也可用此技术。一般要求在麻醉下操作。只有当没有别的方法的特殊情况下，2周后才能考虑用动物恢复的眼眶静脉丛再次取血。这项技术应由训练良好的工作人员来操作，而且只能用动物的一只眼睛。不赞成在无麻醉条件下，用眼球摘除法取血。

在毒物动力学研究中，大鼠采血可采用：尾静脉、趾脉管系、全麻下心脏穿刺、全麻下外颈静脉和总颈动脉插管。

兔和豚鼠可用耳缘静脉、颈静脉或隐静脉。较大动物的采血可从浅表静脉进行(隐静脉、头静脉、颈静脉)。

2. 尿液采集 大鼠和小鼠可用代谢笼，下部有粪尿分离器。在毒物动力学研究中，对半减期长(数小时以上)的受试化学物可用代谢笼，对半减期短的受试化学物可在全麻下经尿道或经腹壁插管至膀胱收集尿液。对犬可用接尿法或导尿法。

3. 胆汁采集 在毒物动力学研究中，可直接插管至总胆管，其尖端应接近肝门区的分叉点。大鼠胆汁一般达0.5～1.0ml h。在插管后应立即给以受试化学物，因为胆盐不能再循环时，胆汁的成分就会改变。对有胆囊的实验动物(如豚鼠和兔)，应在胆囊基底部结扎胆囊，以防止胆囊延缓经胆汁消除。

4. 粪便采集 大鼠和小鼠可用代谢笼，下部有粪尿分离器。对犬和猴可直接取新鲜粪，分析前剥去表层，取内层粪分析。

(二) 麻醉

在麻醉过程中，必须对动物仔细观测。所用技术设备应可对多个系统进行检查，如循环系统(心率、脉搏、血压、心电图、外周灌流量、体温)或呼吸系统(呼吸频率)。在麻醉过程中确定麻醉深度是一个非常重要的步骤。麻醉分为四个时期。

(1)痛觉丧失期(从药效开始发挥到意识丧失)。

(2)兴奋期：从意识丧失开始出现到规则呼吸结束。呼吸不规则，瞳孔扩大，运动反射增强，眼球震颤，角弓反张。

(3)耐受期：从规则呼吸开始到自主呼吸结束。这个时期又分为四段：①规则呼吸，瞳孔缩小、多数反射出现；②骨骼肌松弛，瞳孔缩小，眼睑反射消失，角膜反射出现，呼吸平稳，痛觉缺失，是进行手术的最佳麻醉状态；③只有角膜反射，呼吸非常困难，瞳孔扩大；④没有反射，呼吸非常平稳，瞳孔扩大。

(4)窒息期：反射性膈呼吸结束之后。没有反射，没有呼吸，濒临死亡，需立即使用解毒剂防止死亡。

应用乙醚时上述各期出现较为明显。若不同的麻醉剂联合应用(主要与肌松药联合应用时)，动物的反应会和上述有所不同。

进行手术的最佳麻醉状态是意识丧失，痛觉丧失和松弛。对不同物种，根据麻醉的持续时间，常将短效(30min)、中效(120min)、长效(长于120min)麻醉剂联合用药。

在麻醉时和麻醉后必须检查动物的体温，当体温降低时，要使用加热灯、加热垫。在

麻醉终止后动物要经历和麻醉过程相同但顺序相反的几期(耐受期、兴奋期、痛觉丧失期)。

常用的麻醉药物:

(1)短效:对啮齿类多用乙醚,对大动物可用硫喷妥钠 10~25mg/kg 静脉或腹腔注射。

(2)中效:推荐用赛拉嗪+氯胺酮,对啮齿类 5+100mg/kg 肌内注射,对大动物 2+10mg/kg 肌内注射。

(3)长效:常用戊巴比妥钠,对啮齿类 35~50mg/kg 腹腔注射,对大动物 30mg/kg 静脉或腹腔注射,对大鼠还可用乌拉坦 1500mg/kg 肌内注射。

(三)安死术

安死术(euthanasia)是指用公众认可的、以人道主义的方法处死动物的过程,即达到没有惊恐或焦虑而安静地、无痛苦地死亡。安死方法的最重要性的标准是:安死术应具有保证动物中枢神经系统立即达到失去痛觉的早期抑制作用。选择哪种安死术必须根据待处死动物的感觉能力而不是根据实验观察者或操作者的主观感觉,尽管后者是不容忽视的。因此断头术或放血致昏法还不失为人道主义的安死术。安乐死的方法对动物的物种和年龄应是适宜的,而且应是无痛苦,不引起兴奋,能快速导致意识丧失和死亡。此外,方法应是可靠、可重复和不可逆的。推荐的安乐死方法见表 1-6。

建议在实施任何安死术前,对犬、猫及大型动物,都应使用镇静剂。如果可能,即将处死的动物不应和其他动物在同一个房间里,特别是当用比较残忍的方法时,如断头法。

安乐死之后,确认动物死亡非常关键。死亡症状有心跳、呼吸停止,反射缺失。可通过放血或取出心脏,毁损大脑,断头,切除内脏,出现尸僵等来确保动物死亡。

表 1-6 推荐的安乐死方法

小鼠	大鼠、豚鼠	兔	猫	犬	灵长类
断头 脱颈伴放血 含 80% CO_2 的气体 适宜挥发性麻醉剂 戊巴比妥钠,150mg/kg i.p. (均伴放血)	撞击,脱颈 断头,训练有素者操作 含 80% CO_2 的气体 适宜用挥发性麻醉剂 戊巴比妥钠,150mg/kg i.p.或 100mg/kg i.v	猛击,并用脑定位打击 撞击、伴放血,训练有素者操作 戊巴比妥钠,120mg/kg i.v. (均伴放血)	戊巴比妥钠,100mg/kg i.v.或 200mg/kg i.p.、伴放血)	戊巴比妥钠,100mg/kg,i.v.(伴放血)	戊巴比妥钠,100mg/kg i.v.建议预先用 1~2mg/kg 赛拉嗪加 10mg/kg 氯胺酮 i.m.麻醉动物(伴放血)

(四)病理解剖和标本留取

毒性病理学检查是毒理学试验重要的组成部分,病理学研究有助于确定有害作用和靶器官。毒性病理学检查包括大体解剖和组织病理学检查两部分。急性毒性试验中在试验期中死亡或试验结束处死的动物都应进行尸体解剖,因为急性毒性试验的目的是得到

有关可能的靶器官以及进行重复染毒试验剂量设计的信息。在亚慢性、慢性、致癌试验，病理学是一个重要的终点。

1. 大体解剖　在实验动物处死后半小时内进行，解剖方法采用胸腔、腹腔脏器联合取出法。应观察有关脏器的外形和表面情况、颜色、边界和大小、质地、切面。对指定的脏器称重，并计算脏器系数。推荐的实验动物病理解剖标准操作程序见图1-10。

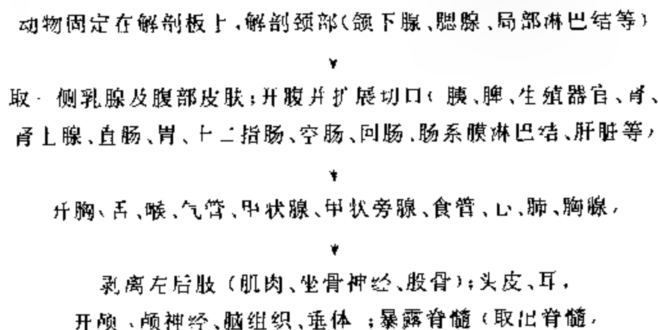


图1-10　实验动物病理解剖标准操作程序（中华预防医学会环境病理学组，1989）

2. 组织病理学检查　对指定的器官或组织用锋利的刀剪取材，应统一取材部位。组织块一般在10倍体积的10%福尔马林液中固定，此后常规制片（组织石蜡包埋、切片、HE染色）。应详细记录显微镜下观察到的病变，并做出病理诊断。必要时，请其他的病理学家对有疑问的或有争论的发现进行复查。利用特殊染色、组织化学及电子显微镜技术可有助于毒作用机制的研究。

第九节　毒理学试验的统计学

统计学观点及方法在毒理学试验的设计和结果评价中起关键的作用。近年来，随着毒理学的研究方法的发展，也推动了生物统计学的研究。在毒理学数据的统计学方法中最主要的发展是剂量-反应关系的统计学方法（定性分析即为趋势检验，定量分析为模型拟合）、超离差（overdispersion）计数资料的统计学方法及广义线性模型（generalized linear model）。这些方法可参阅有关统计学专著，并可以利用统计程序包如SAS，Genstat等来实现。

本节为非专职统计的实验室人员提供有关毒理学试验的统计知识。尽管实验室人员应有足够的知识来处理一些常见的情况，但应强调征求统计学专家意见的必要性。科学期刊中经常出现由于统计学方法使用不当，而使作者的结论没有说服力的报告，如果研究人员能得到一名合格的统计人员的咨询，则可以避免这种情况发生。

（一）毒理学试验设计和统计学要求

毒性试验的目的之一在于确定某种受试物处理是否会表现出某种有害作用。然而，试验组与对照组在反应上表现出的差别并不一定意味着是受试物处理的结果。另有两种引起差别的可能性，即偏倚和偶然性。

偏倚是指系统性误差，而不是由于组间在处理上的不同所引起的差别，正确地设计、

实施和分析研究的结果可有效地消除偏倚。良好的质量保证可以降低随机误差，但偶然因素是不能完全排除的，因为接受同样处理的动物之间的反应不可能全部一样，而统计学分析和评价用来确定随机误差。

统计学的设计和分析应以消除潜在的偏倚来源和减少偶然性为目标。在实验设计和进行毒理学试验中，应考虑以下 10 个方面：动物物种的选择、剂量水平的确定、动物的数量、试验期、检测的准确度、分层、随机化、适当的对照组、动物的放置、数据记录。前 6 项主要是有关减少偶然性的，后 4 项则是与避免偏倚有关的。毒理学试验的设计应遵循随机、重复及对照三个原则，要求各观察值具有代表性，并且是相互独立的。此外，如果同时评价几个不同因素的效应，应注意均衡的原则，应可区分并估计不同因素的贡献。

样本的代表性要求具有同质性，即各处理组和对照组的非实验因素的条件均一致，为此，各实验单位（动物或培养物）的分组及整个实验的全部操作都应遵循随机化原则。在利用形态学指标的毒理学试验，必须采用盲法观察结果，以消除实验者观察结果的偏性。样本应有足够的大小和适当的重复次数，以估计处理之间、实验室内和实验室间的变异性。一般可根据显著性水准、检验把握度、容许误差、总体标准差等来估计样本的大小。

严格执行毒理学试验设计的上述要求，才可能得到可靠性和重现性良好的结果，也是进行正确的统计学评价的基础。

毒理学试验的数据通常是由剂量水平和相应观察值组成的二维关系型数据。一种毒理学试验资料可以有若干种正确的统计学分析方法，但可能不存在惟一正确的方法。其原因主要是表面上不同的统计学分析方法常以相同的统计学概念和模型为基础。另一方面，利用不同的统计学方法来评价毒理学试验资料缺乏比较研究。

1. 实验和观察的单位　实验单位的确定对于样品的独立性是很重要的。实验单位（experimental unit）是进行处理或观察时独立的最大采样单位。实验单位通常是观察单位。但实际并不通常如此，在喂养试验中通常将一笼动物而不是一只动物作为实验单位，因为试验处理是针对一笼动物而不是一只动物进行的。在组织病理学检查中，通常是对每只动物的多个部位进行观察，在这种情况下观察的单位是各部位而不是一只动物。一般，以动物和培养物作为实验单位要比以细胞作为实验单位更为可取。如在小鼠骨嗜多染红细胞微核试验，每鼠观察 1000 个嗜多染红细胞有微核的细胞数，实验单位是各个小鼠，因此，应给出各组小鼠有微核的细胞数的均数和标准差进行统计，而不是报告该组嗜多染红细胞总数。而胞质分裂阻断法体外微核试验一般均以细胞作为实验单位。又如在致畸和生殖毒性试验中由于存在母体窝效应，对活胎体各指标和出生后至离乳前幼体各指标，应以窝为实验单位进行统计分析。

为了按照下文所提出的方法确定试验的作用，重要的是每个实验单位只提供一项数据进行分析，因为所有方法都是假设每一项数据在统计学上是独立的，如果对每个实验单位进行多次观察，则应将这些观察结果恰当地综合，形成一个总的观察结果，然后再进行分析。这样，如果在一项试验中将 20 只动物分为两个受试组，每组 10 只，分别测量动物双侧肾脏的重量，如果将第一组的 20 个重量值分别与第二组的 20 个重量值相比较就是错误的，因为单个肾重并不是独立的观察值。正确的方法应是将第一组的 10 只动物的双肾平均重量值与第二组的 10 只动物的双肾平均重量值进行比较。

2. 反应变量的类型　实验的各剂量组所得到的结果应与同时进行的阴性对照组比

较。根据实验结果(指标)的变量类型选用不同的统计分析方法。毒理学试验中所测定的反应通常可分为以下三类:

(1)有或无:即出现或不出现某种反应,又称计数资料。

(2)等级资料:即反应表现为不同程度,可分为极微、轻度、中等、严重和十分严重几个等级。

(3)连续资料:在一个限定的范围内,可得出该反应的任何量值,又称计量资料。

每种反应类型需要采用不同的统计方法。当分析"有或无"资料时,通常采用列联表分析法,也可以将等级或连续的数据按限定值划分,限定值以上为"有",但这不是通常首选方法,因为它造成资料浪费。毒理学试验处理组与同时进行的阴性对照组观察值进行比较,如果资料可拟合某种分布,则适用于参数检验,其敏感度和效率高于非参数检验。对连续数据如资料不能拟合某些已知的分布,则应进行数据转换,以满足正态性和方差齐性。如果任何变换都不能改善数据的分布,可能存在个别可疑值,应予以识别和剔除,再进行拟合。常见的是钟型正态分布或高斯(Gaussian)分布。如果假设的这种分布是正确的,该方法就是最好的,而如果假设是严重错误的,则会导致错误的结论。因此,在对所得到数据的统计学分布产生疑问时,通常最好采用适合于分级数据的方法来分析连续的数据,因为这类非参数统计方法不依赖总体分布模型的假设。

3. 试验组间进行比较的形式　在用两个试验组进行试验时只可能有一种比较,但如有两个以上试验组,则就不同了。在有 K 个(>2)试验组的试验中,两种最重要的统计分析是检验其差别的显著性以及剂量反应关系研究。

非均匀性检验是从总体上确定是否有明显的证据表明与"各组在反应上无差别"(无效)的假设不同。这类检验通常是可行的,但并非十分有帮助,因为它并不考虑反应的类型。

剂量反应关系的检验只适用于各组接受相同的受试物,但剂量不同。它用于确定反应加强的趋势是否与受试物的剂量有关。剂量-反应的判定可以分为定性和定量统计学两大类。剂量-反应关系的统计学定性分析即为趋势检验,而统计学定量分析则为模型拟合。趋势检验是检验对自变量 X 规定的水平,反应的观察值增高或降低的趋势的显著性。如用图表示,则这种检验可以观察剂量(X 轴)和反应(Y 轴)的关系,作为一条斜线来处理是否比一条水平线更恰当。尽管在真正的无阈限的线性关系时,这是一个非常好的检验,但在统计学上显示有明显的正比趋势时,并不意味着在整个剂量范围内,反应都会随着剂量的加大而增强。在受试组单纯与对照组比较时,趋势检验常常可以发现其具有显著性。

有时也会出现趋势检验无显著性的情况,例如,各组间存在着明显的差别,但没有明显趋势的证据。这可能是由于某种原因在较低剂量时反应加强,但在高剂量时却减弱。在这种情况下,最好只采用对照组和几个低剂量组的资料来检验变化趋势。

4. 分层设计和统计　在毒理学研究中,最简单的情况是在试验中所有各组动物只在试验处理上存在系统差别。然而,往往在几批动物中,每批动物之间只是在试验处理上存在系统差别,但每批动物都有不同特点,最常见的情况是动物的性别不同,而且还有其他可能,如反应变量的测量条件不同等。通常研究每一批动物或每一"层"的内部以确定每种处理情况的作用。另外,也可根据各层的资料,来综合确定整体的试验作用,在某些情况下,由于每"层"的动物数量较少,不容易在各"层"中出现显著的试验作用,因而只有将

各"层"的结果综合分析才能得出明显的结论。分层的基本点在于可在各"层"中(内部)进行比较,然后总合各"层"在处理上的差别,将各"层"的数据混合在一起,然后进行简单的比较会导致错误性的结论。为了说明这点,假设一项试验在第一批动物中,10只对照动物5只出现反应,受试动物30只中有12只出现反应;而在第二批动物中,30只对照动物中6只出现反应,受试的10只动物只有1只出现反应,如果打破批的界限,则在40只对照动物中有11只出现反应,而40只受试动物中有13只出现反应,这就会得出错误结论,即处理促进了反应的出现,正确的分析方法应是将"批"作为分层的因素,则不论第一批动物(50%对40%)还是第二批(20%对10%),对照组的反应率均比受试组高,因而,综合这两种差别,则可以得出"处理使反应降低"的正确结论。

5. 年龄校正　对于许多情况,如肿瘤的发生,其发生率明显地随着年龄的升高(及接触受试物时间的延长)而升高,并且受试组的总发病率不仅取决于活得长的动物的比例,同样地取决于试验处理的作用。为了校正不同存活时间,通常将年龄作为分层变量,这样可使各组之间的比较在相似年龄的动物中进行,再将各年龄层的结果综合评价。通常对动物年龄的校正应用于确定一种毒性作用存在与否,正确的方法取决于对反应的观察,这里有三种不同情况。

(1)在生命期内可见到的反应,这是计算在此段时间内出现该反应的动物数占试验初期未出现该反应的动物数的比例。

(2)只在死亡时才出现的反应,并且认为这种反应是致死性的。这是计算在此段时间内由于该反应而死亡的动物数占试验初期存活的动物数的比例。

(3)只在死亡时才出现的反应,但认为这种反应不是致死性的。这是计算在此段时间内发生该反应的动物死亡的数量占此段时间所有死亡的动物数的比例。

6. 每只动物的多次观察　当对每只动物进行多次观察时,根据实验情况和目的,可采用其他一些统计分析方法。本节并不是总结所有的可能性,但以下几种情况比较常见。

(1)变量间的相关性:每只动物都观察两个或两个以上不同变量,其目的是确定这些变量值是独立的还是相关的。

(2)变量间的关系由于试验处理而出现改变:对每个受试组,计算出变量间关系的指标,而统计学要解决的问题是检验该指标是否是由于受试物处理而明显改变。

(3)相同变量的多次观察:通常在长期试验中要定期对同一动物检测体重和临床化学指标。虽然可以根据某一次检测获得的资料进行各组间的比较,但这对于任何一次分析来讲,信息量都是有限的。另外还有统计学方法可以比较各组在两次检测间反应的变化,或更为常见的是比较各组在一段时间中反应的总模式。

(4)动物内部的比较,在大多数毒理学试验中,不同的动物接受不同的试验处理,比较也是在动物间进行的。而在某些试验中,同一动物接受多种试验处理。这种情况下,需要采用正确的统计学方法进行动物内部的比较。

7. 假设检验和概率值　毒理学试验报告中经常出现这样的叙述:"在处理因素与血糖水平之间具有统计学的显著性($P=0.02$)"。其真正的含义可用以下三点来说明。

(1)"生物学显著性"与"统计学显著性"的含义不同。很可能有时一种相关是偶然出现的,因而虽具有统计学显著性,但却无生物学意义,即动物的健康并未受到影响。反之,一项结果可能具有生物学意义,但在统计学上却无显著性。例如,在受试动物出现一、两

个极少见的肿瘤。全面评价实验资料必须同时考虑生物学和统计学两方面的意义。

(2)"P 0.02"并非是指不出现试验作用的概率是0.02,真正的意思是假设试验处理并不引起任何作用(即所谓无效假设),则获得真正有显著性差别的概率是0.02。

(3)概率值(P)有两种类型:一是单侧P值,是指试验作用中朝一个方向(只能增加或减少)的作用等于或大于所观察的作用的概率;另一个是双侧P值,是指试验作用在正反两方面(既可增加,也可减少)的作用等于或大于所观察的作用的概率。无论何时引用"P值",都需说明所采用的为哪种类型。通常"双侧P值"是较适宜的。但如果有前提原因,只期望一个方向的试验作用,则一般采用"单侧P值"。当使用"单侧P值"时,应忽略与设想的相反方向的改变。

当P值小于等于0.001时,其本身就可令人信服地证明真正存在着试验作用;面较小的P值(如P=0.05)可提示可能存在试验作用,还要用其他资料补充或加强。如果出现的改变与以往试验所报告的相似,或根据生化方面的考虑预期出现某种作用,则与未预期的或在其他剂量中未出现的作用相比,只需要较大的P值就可说明问题。在报告结果时虽然不一定需要给出确切的P值,但对于用符号表示P值和可信程度还是有必要的,在表达多个变量结果时,更易于使研究结果一目了然。

8. 多重比较 毒理学试验经常在试验和对照之间作多个变量的比较。即使不存在真正的试验作用,也有可能纯粹由于偶然性而在一个或多个变量在95%置信限水平出现显著性差别。例如,在100个独立的变量中,至少有99.4%的可能使一个变量出现显著性差异。正因为如此,曾建议随着变量数目的增多,应将具有统计学显著性的临界值作更严格的规定,以致在95%置信限水平检验时,19 2。的变量均无统计学显著性。这个方法不是首选的,因为通常在毒理学试验中,一种受试物只有一两个真正的作用,而对所研究的其他许多变量并无作用。这种多重比较很难表明真正作用的统计学显著性。不管怎样,一种处理与某种反应的关系主观地决定于同时观察的其他反应是不能令人满意的。由于这个原因,下文中没有介绍此类方法。

(二)统计学分析:推荐的方法

1. 根据资料类型和统计学要求 下表为IPCS专家组推荐的统计学分析方法(表1-7)。对于数学方面的细节,可参阅有关专著和参考文献。

表1-7 IPCS专家组推荐的统计学分析方法

数据类别和统计学要求		统计学方法
1."有或无"数据		
动物间的比较	个别组的比较	Fisher精确分布检验(不分层的数据) 2×2校正的卡方检验(分层或不分层的数据)
	非均匀性	2×K卡方检验(分层或不分层的数据)
	与剂量相关的趋势	Armitage检验(分层或不分层的数据)
动物内部比较	个别组的比较	McWemar检验或符号检验
	非均匀性	Cochran检验
	变量间的相关性	Fisher精确分布检验 2×2校正的卡方检验

续表

数据类别和统计学要求		统计学方法
2. 分级数据		
动物间的比较	个别组的比较	Mann Whitney U 检验
	非均匀性	Kruskal Wallis 单向方差检验
	与剂量相关的趋势	非参数趋势检验
动物内部的比较	个别组的比较	Wilcoxon 配对符号秩和检验
	非均匀性	Friedman 双向方差分析
	与剂量相关的趋势	Page 检验
	变量间的相关性	Spearman 等级相关系数
3 连续数据		
下列方法假设各组方差呈正态和方差齐性。应先:①检验和剔除界外值,②用 Bartlett 检验方差齐性;③如方差不齐,可用对数和(或)平方根转换法,如转换后仍不齐,则采用分级数据的方法		
动物间的比较	个别组的比较	t 检验
	非均匀性	单向方差分析
	与剂量相关的趋势	线性回归分析
动物内部比较	个别组的比较	配对 t 检验
	非均匀性	双向方差分析
	与剂量相关的趋势	线性回归分析
变量间的相关性	各组变量间相关性的变化	Pearson 相关系数协方差的分析
	变量随时间而变化	用方差分析评估第一个时间与第一个时间的差别

2. 对常规毒理学试验资料推荐的统计学方法

(1)体重和器官重量:体重常是毒性效应最敏感的指标之一。如果每组样品量足够大(10 或 10 个以上)、可用下述方法:①按体重或体重改变分析。如在试验开始,动物随机化分组(各组体重均数差别无显著性,各组所有的动物体重在总平均体重的 2 个 SD 之内),利用体重改变分析比较好。②器官重量计算为体重的百分比。③对各组资料利用 Bartlett 方差齐性试验,检测方差齐性。根据方差齐性或不齐,决定进一步的统计学检验。如果样本量较小,可利用 Kruskal Wallis 非参数检测。

(2)临床化学:过去一般用 t 检验或 ANOVA,但并非是最适当的方法。因为这些生化参数很少是彼此独立的。通常,所研究的并不是单独某一个参数,而是与靶器官毒作用有关的一组参数,如 CPK、HBDH 和 LDH 同时增高强烈指示心肌损害。这时我们并不只是注意其中一个参数的增高,而是全部 3 个参数。而血清电解质(如钠、钾、钙)常相互影响,一种降低常伴另一种增加。而且应重视资料的性质,由于这些参数的生物学性质或测定的方法,常不服从正态分布(为偏态分布)或为非连续的,如肌苷、钠、钾、氯、钙和血尿素氮。临床化学资料适用的统计学方法:①ANOVA、Bartlett 检验和(或)F 检验、t 检验,

适用于：钙、葡萄糖、BUN、肌酐、胆碱酯酶、总蛋白、清蛋白、HBDH、ALP、CPK、LDH、ALT、AST及血红蛋白。②Kruskal Wallis非参数ANOVA，适用于：总胆红素、GGT。

(3)血液学：不同物种、品系的实验动物血液学检查的数据，所服从的分布也可能是不同的。这些参数的大部分是相互有关的，并依赖于所用的测定方法。RBC数、血小板数和MCV可用仪器测定，数据适用于参数检验。血细胞比容(HCT)是由RBC和MCV得到的计算值，故依赖于此两个参数；但如直接测定，也可用参数检验。

血红蛋白是直接测定的并是独立的连续数据。但如同时存在血红蛋白的多种形态(氧血红蛋白、脱氧血红蛋白、高铁血红蛋白等)，则可能不是典型的正态分布，而呈多模型分布。此时可用Wilcoxon检验或多重秩和检验。

WBC总数服从正态分布，并适用于参数检验。而WBC的分类或报告为百分比或乘以WBC总数得"绝对"分类WBC数。这些资料，特别是嗜酸性粒细胞不符合正态分布，应该用非参数统计。

应注意，单个参数的变化很少有生物学意义，因为这些参数是相互有关的，应注意发现并分析预期的参数变化谱。

(4)组织病理学损害发生率：在亚慢性和慢性毒性试验，强调了组织病理学检查。统计学分析是评价处理组动物组织病理学损害发生率是否高于对照组动物。除了癌发生率外，也应注重发现其他病理损害。

处理组和对照组动物病理损害发生率的比较常用卡方检验或Fisher精确检验。利用双侧检验还是单侧检验取决于研究者的要求。对于多重比较可用Bonferroni法，而且可利用趋势检验来评价剂量反应关系。

(5)生殖毒性：对生殖毒性的统计学分析，是以窝(或妊娠雌性动物)为实验单位，而不是幼体。生殖毒性试验一般可得4个变量：生育力指数(FI)、受孕指数(GI)、存活力指数(VI)和哺育指数(LI)。对这些变量，如样本数为10或10以上则可利用Wilcoxon Mann Whitney U检验或Kruskal Wallis非参数ANOVA。如样本数小于10，则可用Wilcoxon秩和检验(用于2组比较)或Kruskal-Wallis非参数ANOVA(用于3组或3组以上的比较)。

(6)致畸试验：每组应有20只妊娠动物。并且，实验单位为窝，而不是胎体。如样本数为10或10以上，可近似为正态，利用参数检验(如卡方检验、t检验或ANOVA)来评价结果。当样本数小于10，可用非参数检验(Wilcoxon秩和检验或Kruskal Wallis非参数ANOVA)。此外，Wilcoxon Mann Whitney U检验也广泛用于致畸试验。

(7)饲料和染毒柜中受试物浓度分析：当受试物掺入饲料进行喂饲试验，或为气溶胶吸入试验，应定期测定饲料中受试物浓度和染毒柜中受试物气溶胶的浓度。采样应随机并有代表性。一般要求饲料或空气中浓度应在预定浓度的±10%之内。显著增高的峰浓度可能超过代谢或修复系统能力，出现急性毒作用。如果不了解饲料、空气中真实的暴露水平，可能错误地解释该受试物的低水平慢性毒性。

气溶胶颗粒直径分级采样可能得到分类资料(如>100μm，100～25μm，25～10μm，10～3μm等)，这种资料应该用几何均数及其标准差来描述。

(8)致突变性试验：绝大多数遗传毒理学短期试验(STT)的观察值为计数资料(如突变体数、畸变数、SCE数)或是相对数(如存活细胞的突变频率)，因此STT结果的统计学

主要是对离散性资料的统计学推断。

从理论上来说，突变是罕见事件，服从泊松分布，但实际上，STT 数据分布模型很复杂，也可服从二项分布、负二项分布等。样本分布的研究可用拟合优度卡方检验、似然比检验、精确检验、Kolmogorov-Smirnov 检验及 Fisher 推荐的离差检验。STT 资料通常比常规的统计学分布模型具有更大的变异性，样本数据的均数与分布模型拟合较好，而方差显著大于模型的方差，即出现超离差(overdispersion)。超离差可假定分布的均数服从某一特定的分布来表达，即构成复合分布(compound distribution)。如负二项分布可记为泊松 * 伽马复合，其他还有多种复合分布，如泊松 * 反伽马复合、泊松 * 正态复合等。忽视超离差可使假设检验的第一类错误概率增加、参数估计的可信区间过窄。因此，超离差是 STT 资料统计学分析的重要问题。对超离差计数资料的统计学方法可参阅有关统计学专著，以下仅介绍最常用的遗传毒理学试验的统计学方法的进展。

1)Ames 试验的统计学评价：Ames 试验的结果每平板回变菌落数的分布不完全服从泊松分析，有超离差现象；并且，其剂量反应曲线呈先上升后下降的伞形。Ames 等 1975 年提出 2 倍判断标准，在 1983 年改进的方法中已不再推荐。2 倍判断标准有较大的缺点，此判断标准不是统计学判断，对自发回变率较高的菌株偏严，而对自发回变率较低的菌株偏松。已发展了几种统计学方法用于 Ames 试验的假设检验和剂量反应研究。Kim 和 Margolin 等(1999)利用基于生物学的机制模型，发展了 SALM 程序，用于 Ames 试验结果的判断

2)遗传毒理学体内试验(包括微核试验、染色体畸变试验和显性致死试验)的统计学评价：(图 1-11)

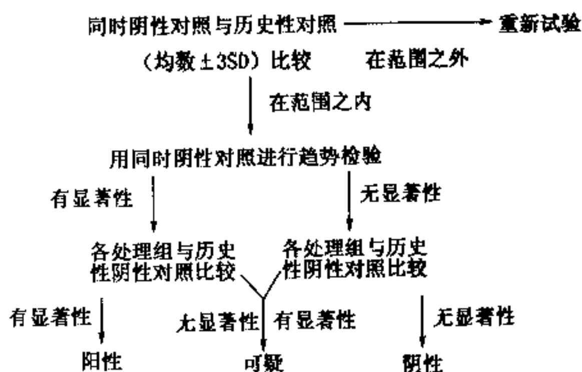


图 1-11 遗传毒理学体内试验统计学评价的程序

Adler 等(1998)提出了 3 步法：①确定实验结果是否可接受。如果同时进行的阴性对照的均数在历史性对照的均数±3SD 之内，则该实验结果可以接受。如果不接受，则应重新进行实验。②剂量-反应分析。利用同时进行的阴性对照资料进行剂量-反应趋势检验。有统计学显著性的阳性趋势表明受试物处理的效应。③评价各个处理组反应，然后将各个处理组的均数分别与历史性阴性对照比较，如各个处理组均未显示差别显著性，但趋势检验有显著性意义，此实验结果的解释需要生物学判断。如果趋势无显著性，但经多重比较校正后仅一个处理组与历史性阴性对照比较差别有显著性，则此试验结果的解释也需要生物学判断。这时，可认为该实验的结果为可疑。

(9)行为毒理学：行为毒理学试验一般得到 4 种类型的资料：①观察的记分值，来自开阔场试验等；②反应率，来自舔液，总活动或压杆；③错误率，来自学习记忆试验；④到达终点的时间。对这些数据常用的和推荐的统计学方法见表 1-7。行为发育毒性和生殖毒性研究的统计学方法见表 1-8，在断乳前应以窝为实验单位进行统计。

表1-8 行为毒理学的统计学方法

观察类型	常用的方法	推荐的方法
观察记分值	t检验或单侧ANOVA	Kruskal-Wallis非参数ANOVA或Wilcoxon秩和检验
反应率	t检验或单侧ANOVA	Kruskal-Wallis ANOVA或一侧ANOVA
错误率	ANOVA检验，再进行Post hoc检验	Fisher精确检验或R×C卡方，或Mann-Whitney U检验
到达终点时间	t检验或一侧ANOVA	ANOVA检验再进行Post hoc检验或Kruskal-Wallis ANOVA
行为发育或生殖试验	ANOVA检验，再进行Post hoc检验	Fisher精确检验或Kruskal-Wallis非参数ANOVA或Mann-Whitney U检验

(10)质量控制图：毒理学试验中各种实验室检验可参照临床实验室制作质控图(control chart)，旨在直接观测误差趋势，便于及早采取措施，预防和杜绝不合格的实验报告。质控图的种类较多，最常用的是Levy-Jennings常规质控图。如果再辅以累加(Cusum)质控图更易发现系统误差。

(三)统计学意义和生物学意义

在评价毒理学试验的结果时，应综合考虑统计学意义和生物学意义。统计检验的假设是关于总体特征的假设，检验方法是以统计量的抽样分布为根据的，得到的结论是概率性的，不是绝对的肯定或否定，不等同于有或无生物学意义。对实验结果作出科学的判断和解释，应该根据统计学分析的结果、生物学知识和经验。

一般来说，具有统计学意义是具有生物学意义的必要条件之一。正确地利用统计学假设检验的结果有助于确定实验结果的生物学关联。在判断生物学意义(即生物学重要性)时，可考虑以下步骤。

(1)纵向比较，此参数的改变有无剂量-反应关系。化学物毒作用的剂量-反应关系是毒理学研究的基本假设。当某参数的改变存在阳性剂量-反应关系，就可认为此参数的改变与受试物染毒有关，具有生物学意义。

(2)横向比较，此参数的改变是否伴有其他相关参数的改变。例如，生化参数很少是彼此独立的，单个剂量组的一个参数有统计学显著性的改变一般不认为有生物学意义，除非此改变为其他参数改变所支持。如没有骨髓或脾组织学改变或没有高铁血红蛋白生成，则单有红细胞计数的改变是没有生物学意义的。同样，在免疫毒理学中，单有淋巴细胞计数的改变不伴有淋巴结组织学改变也可能是没有生物学意义的。在某一剂量组的某脏器重量和脏器系数与对照组比较，差异均有显著性，可认为具有生物学意义。

(3)与历史性对照比较，由于目前尚无公认的实验动物"正常"参考值，应由本实验室利用相同品系的实验动物和相同的溶剂，进行至少10次独立实验的阴性(溶剂)对照的资料构成，以其均值±1.96×标准误作为参考值的范围。同时进行的阴性对照组均值应在历史性对照的均值±3s范围之内，否则应重新试验。另有认为，凡某种观察值与对照组比较，差别具有统计学显著性($P<0.05$)，并符合下列情况之一者，即可认为具有生物学意义：①其数值不在参考值范围之内；②其数值在参考值范围之内，但在停止接触后，此种

差异仍持续一段时间；③其数值在参考值范围之内，但如机体处于功能或生化应激状态下，此种差异更加明显。应该指出，后两种情况需要附加的试验设计。

另外，还有一些其他的考虑。如

（1）组间差别的程度和性质：如对体重或脏器重均值与对照组比较，差异有显著性，但仅在改变超过对照组值的10%以上时，才认为具有生物学意义。某些血液生化指标（如AST、ALT等）的测定值升高才有生物学意义等。

（2）与受试物处理有关的改变往往同时出现在两种性别。当然，应考虑到毒作用具有性别差异，在某一性别的动物的处理组与对照组比较差异有显著性，而另一性别未发现差异有显著性时，判断应慎重。

（3）效应的重现性：与同时对照组比较，如多个剂量组发现差异有显著性，则应认为此效应与受试物处理有关。如在同一物种另一次独立的实验中，发现同样的差异，或在另一物种的实验中，发现同样的差异，则生物学意义更肯定。如在同一物种另一次独立的实验中，没有发现同样的差异（缺乏重现性），则该差异很可能是出于偶然性。

当处理组数据与阴性对照组比较差别有显著性，并且经分析认为是与处理有关的生物学效应，应进一步判断其为有害效应还是非有害效应，决定一种效应是否为有害作用需要专家的判断。

表1 9 毒理学试验结果的统计学意义和生物学意义

生物学意义	统计学意义	
	无	有
无	Ⅰ	Ⅲ
有	Ⅱ	Ⅳ

在分析和综合评价实验结果的统计学意义和生物学意义时，可能遇到四种情况，见表1 9。在此表中，第Ⅰ和第Ⅳ种情况最为常见，第Ⅰ种情况是无统计学意义也无生物学意义，第Ⅳ种情况是有统计学意义也有生物学意义。但是有时在实验结果中会出现第Ⅱ和第Ⅲ种情况。

第Ⅲ种情况是有统计学意义但无生物学意义，例如在某个亚慢性毒性试验中，中剂量组动物血液白细胞计数低于阴性对照组，差别有显著性（$P<0.05$），而高剂量组和低剂量组动物血白细胞计数与阴性对照组比较差别无显著性（$P>0.05$）。由于在此实验结果中未出现剂量 反应关系，因此中剂量组血白细胞计数降低可能是由于偶然因素造成的，没有生物学意义。但是，如果仅在高剂量组动物血白细胞计数降低，与阴性对照组比较差别有显著性（$P<0.05$）时，必须仔细地核实高剂量组的资料。如果资料无任何疑问，可认为此变化可能具有生物学意义。最好是重新进行一个亚慢性毒性试验，并加大受试物的剂量，如果能够观察到剂量-反应关系，则说明此剂量组血白细胞计数降低是有生物学意义的；如果加大受试物剂量没有观察到剂量-反应关系，才可以说此剂量组血白细胞计数降低没有生物学意义。因此，在判断实验结果的生物学意义时，有无剂量 反应关系是关键。有统计学意义但无生物学意义的情况，更常见的是因为实验设计不良所致。

第Ⅱ种情况是具有生物学意义但无统计学意义，这可能是因为该事件的发生是极端罕见的，例如在哺乳动物致癌试验中，在染毒组中出现对照组中没有的肿瘤类型，尽管从统计学上此种肿瘤的发生率很低，与对照组比较差别无显著性（$P>0.05$），但还应该认为是有生物学意义的。

利用一种以上的实验动物，当某种效应在一个物种出现而在另一物种不出现，或一个

物种远比另一物种敏感时，则使结果的解释复杂化，难以确定以哪个物种的实验结果外推到人最为合适。除非有足够的资料（通常是比较毒动学或毒效学资料）可以表明最合适的物种，一般是以最敏感的物种来确定 NOAEL 和安全限值。

第十节 优良实验研究规范

以上各节我们讨论了毒理学动物实验的基础，介绍了对外源化学物进行毒性评价的实验设计、实施、结果分析等各个环节。实验的质量控制是保证实验数据具有科学性、准确性和公正性的先决条件。没有质量保证，实验数据的可靠性是无法肯定的。GLP 是优良实验研究规范（good laboratory practice）的简称。GLP 是针对药品、食品添加剂、农药、化妆品及其他医用物品的毒性评价制订的管理法规。根据国际惯例，GLP 专指毒理学安全性评价实验室的管理。

GLP 是由发现问题开始，并在实施和检查中确立的。在 20 世纪 70 年代中期，美国 FDA 在评审复核药厂新药申报资料时，发现在报告中有相互矛盾的数据和无法接受的实验室工作规程，为此开始追因调查，并扩展到其他实验室，如美国最大的 IBT（工业生物实验室）和 BTI（生物检测公司）。EPA 发现 IBT 的 801 项重要研究中有 596 项无效，占 75%，FDA 发现 66 项重要研究中有 24 项无效，占 36%。根据上述调查事实，IBT 公司 4 名官员被指控犯有欺骗罪，其中 3 人受到惩罚，另 1 人因健康原因而未被罚。为此 FDA 于 1976 年颁布了 GLP。此后各国和一些国际组织（如 EU、OECD）相继制订各自的 GLP。近年来，一些国家签订了双边协议，相互接受和认可安全性评价资料。1993 年 12 月中国国家科委发布了“药品非临床质量管理规定”，1999 年国家药品监督管理局，修订 GLP 规范。

GLP 就是在科学的、全面的、全过程的严格管理和监督下，全体工作人员的自觉遵守 GLP 的规定，提供准确的、可信的实验数据和报告。

安全性评价的最终产品并没有实体，而是数据。因此难以通过检查最终产品来保证其质量，只有通过保证有关安全性试验的计划、实施等所有的因素和过程的可信性才能保证最终产品的可信性。这就要求：①组织体制以及责任体制的明确化；②试验、操作规程的标准化；③按照计划、操作规程实施试验；④保存标本、记录；⑤积极地保证可信性。

GLP 实验室的组织体制见图 1-12。GLP 的要点是：机构负责人要全面履行其责职；工作人员必须通过相应的意识教育和技能培训；建筑和设备、仪器必须正常维护，良好运转；实验必须有明确的方案、计划、程序、规范；实验必须按书面指令进行；全部数据应有完好的记录和档案；终结报告必须准确反映和记录所采用的方法和全部数据；独立的和全过程的质量保证。

GLP 实验室的各项工作都要形成文件、规范运行。为保证试验的正确性和稳定性，应编制本实验室的标准操作方法（standard operating procedure，SOP）。SOP 的种类：受试物及对照物质管理；设施内的仪器或设备的检修、维修；动物饲养设施的完善；试验动物的饲养及管理；试验动物一般体征等的观察；试验动物操作、检查、测试及分析；濒死及死亡动物的处理；动物的解剖及尸体的解剖检查；标本的采集及识别；组织病理学检查；原始数据的管理；质量保证部门的任务；试验就业人员的健康检查；其他必要的事项。

GLP的基本精神就是全面的质量管理。GLP规范中特别强调质量保证(quantity assurance,QA),包括独立行使职权的质保部门,具有监督检查权利的质保人员,明确规定"第三者监督"、"非研究人员担任"、"对总负责人负责"等,GLP中的QA精神的实质在于从客观上保证实验的可信度。QA的职责是:①对计划是否正确的记载了GLP规定的各个项目;②实验是否严格、准确的按实验方案和标准操作规程进行的;③评价报告是否在正确记录的基础上,正确的分析并得出正确的结论;④评价动物、动物设施、供试品调制,记录和档案等是否正常运转,并为实验按GLP进行提供保证。



图1 12 GLP实验室的组织机构示意图

GLP的各个环节又可分别称为硬件(建筑设施、仪器等)和软件(人员素质、标准操作规程、质量保证)。在实施GLP中,重硬件、轻软件或相反,或忽视链条中的某个环节,都不能达到GLP的预期目的。

在毒理学实验中,对化学品或产品进行安全性毒理学试验必须自觉遵循GLP原则,这是国家法规要求的。在其他机制毒理学研究如靶器官毒理学研究、细胞毒理学研究、分子毒理学研究中虽然没有强制性GLP规定,但GLP有关原则也有助于这些研究的实施和质量保证。

(周宗灿 肖 杭)

第二章

一般毒性试验

第一节　急性毒性试验

一、经口急性毒性试验

（一）目的

化学毒物经口急性毒性试验是研究化学物毒性效应的基本试验。本实习的目的是学习急性毒性试验的实验设计原则，学会经口灌胃技术、随机分组方法，掌握主要的 LD_{50} 计算方法和急性毒性分级标准。

（二）原理

选择健康的实验动物，根据体重按随机分组的方法，依据 LD_{50} 计算的设计原则将动物分成数个染毒组。一次或 24h 内多次给予受试物后，了解动物所产生的急性毒性反应及其严重程度，中毒死亡的特征以及可能的死亡原因，观察受试物毒性反应与剂量的关系，求出半数致死剂量（LD_{50}），并根据 LD_{50} 值将受试物进行急性毒性分级。

（三）内容

1. 健康小鼠或大鼠的选择，性别的辨认。
2. 称重、编号和随机分组方法。
3. 受试化学物溶液的配制。
4. 小鼠和大鼠经口灌胃操作技术。
5. 毒性体征的观察、LD_{50} 计算和毒性分级。

（四）材料和试剂

1. 实验动物　健康成年小鼠或大鼠若干只。

2. 器材　灌胃针（大鼠、小鼠适用）、注射器（0.25，1，2，5ml）、吸管（0.1，0.2，0.5，1，2，10ml）、容量瓶（10，25，50ml）、烧杯（10，25，50ml）、滴管、电子天平（感应量 1 10000g）、动物体重秤、外科剪刀、镊子。

3. 试剂　受试物（由指导教师自定），苦味酸酒精饱和液、0.5%品红溶液或其他染色剂。

（五）操作步骤

1. 健康动物的选择。
2. 性别辨认。

3. 动物称重、编号和分组：

(1)称重：称量大、小鼠体重的秤，其感应量需在0.1g以下，并经过校正。称量时注意轻抓轻放动物，避免激惹，等动物安静后记录体重读数，以g表示。

(2)编号：以染色法编号。用苦味酸酒精饱和液为染料。以黄色为个位数号码，红色为十位数号码。一般以头部为1号，按顺时针依次右前肢为2号，右腰为3号，右后肢为4号，尾根部为5号，右后肢为6号，左腰为7号，左前肢为8号，后背为9号，10号为在头部染红色标记，11号在右前肢染红色和黄色标记各一，依次类推。

(3)随机分组。

4. 剂量设置　由指导教师根据受试物类别，选择LD_{50}计算方法设计剂量组。

5. 受试物的配制

(1)量取受试物：固体化学物采用称量法，液体化学物可用称量法或吸量法。

1)称量法：将受试物放入已知重量的容器内称重。加溶剂溶解或稀释，倾入刻度容器(如容量瓶)内，混匀，再加溶剂至刻度。算出浓度(mg/ml)备用。

2)吸量法：依设计剂量计算出应吸取液态受试物的容积，加入容量瓶中，用溶剂加至刻度。计算公式为：

$$X=\frac{A \cdot V}{d \cdot 1000}$$

式中：X：应吸取受试物的容积(ml)；

A：设计要求的受试物浓度(mg/ml)；

V：容量瓶容积(ml)；

d：受试化学物比重。

(2)受试物的稀释

1)等浓度稀释法：将受试化学物配成一种浓度，此时各剂量组的实验动物将给予不同体积的受试物。例如受试物配成1000mg/10ml的溶液，五个剂量组的剂量分别为100、200、400、800、1600mg/kg，则各剂量组动物将依次给予1.0ml/kg、2.0ml/kg直至最高剂量组的16ml/kg。

2)等容量稀释法：按照事先设计的剂量分别稀释配制为几种不同浓度的受试物溶液，而各个剂量组的动物均给予相同单位体重体积的受试化学物。如上例的情况，将受试物分别配成100mg/10ml、200mg/10ml、400mg/10ml、800mg/10ml、1600mg/10ml 5个浓度的溶液，各剂量组动物给予受试物的体积均为10ml/kg。

6. 灌胃操作　小鼠、大鼠及豚鼠灌胃法：采用专用小鼠和大鼠灌胃针，也可自制。将钝头的16号注射针(适用于小鼠)或20～24号腰穿针(适用于大鼠、豚鼠)(注意事先可用焊锡在针尖周围焊一圆头，使其不易损伤动物的消化道)安装在适当容积的注射器上，吸取所需的受试物溶液，左手抓住动物双耳后至背部的皮肤(小鼠仅抓住耳后、颈部的皮肤，用无名指、小手指和大鱼际肌将其尾根部压紧)，将动物固定成垂直体位，腹部面向操作者。注意使动物的上消化道固定成一直线。右手持注射器，将针头由动物口腔侧插入，避开牙齿，沿咽后壁缓缓滑入食管。若遇阻力，可轻轻上下滑动探索，一旦感觉阻力消失，即可深入至胃部。如遇动物挣扎，应停止进针或将针拔出，千万不能强行插入，以免穿破食管，甚至误入气管，导致动物立即死亡。

一般进针深度小鼠2.5～4cm，大鼠或豚鼠4～6cm。为了验明是否已正确地插入胃部，可轻轻回抽注射器，如无气泡抽出，表明已插入胃中，如有大量气泡，则提示误插气管，应抽出重插。随后将受试物溶液注入。灌胃容量小鼠通常为0.2～1ml，大鼠1～4ml，豚鼠1～5ml。

7. 中毒体征和动物死亡情况观察　染毒后注意观察毒性体征和死亡情况。高剂量组动物的死亡常很快发生，染毒后应即刻密切观察。观察和记录中毒体征及出现的时间、死亡数量和时间及死亡前的特征。根据观察情况分析中毒特点和毒作用靶器官。按照实验结果，填写急性毒性实验记录表(表2-1)。

表2-1　急性毒性实验原始记录

受试物名称：　　受试物性状　　受试物来源：

动物种属品系　　动物来源及合格证号：

染毒途径　　室温：　　日期：

剂量组别(mg/kg)	动物编号	性别	体重(g)	染毒量(ml)	染毒时间	体征及出现时间	死亡时间	体重记录(g)

实验操作者：　　实验记录者

LD_{50}计算：根据受试物的种类由指导教师事先确定采用何种方法(改进寇氏法、霍恩法等)进行计算，并在试验前设计剂量分组和每组动物数。选择适宜的方法求出LD_{50}及95%的可信限范围。如毒性反应存在性别差异，应分别求出不同性别动物的LD_{50}值。LD_{50}的常用计算方法见附录。

(六) 结果评定

根据实验动物中毒体征、死亡时间和特征、LD_{50}，按受试物种类，分别参照相应的经口急性毒性分级标准进行评定，判断该受试物的毒性大小及毒性特征。

(七) 实验报告

实验报告应包括以下内容：

1. 实验动物的种属、品系、性别及来源。实验前动物禁食和健康状况。
2. 实验动物体重和随机分组情况。
3. 受试物的名称、来源、纯度、性状等情况。
4. 受试物的配制和溶媒。
5. 详细描述实验观察的中毒表现和死亡情况等(表2-1)。
6. LD_{50}的计算方法和结果。
7. 受试物的毒性分级、分级依据和结果评价。

(八) 附录

LD_{50}(LC_{50})的计算方法很多，其中比较常用的有改进寇氏法、霍恩法、序贯法和Bliss法。

1. 改进寇氏法　是利用剂量对数与死亡率呈S型曲线而设计的方法，又称Karber法或平均致死量法。该法计算简便，准确率高，是较为常用的方法。本法要求每个染毒剂量组动物数要相同，各剂量组组距呈等比级数，死亡率呈正态分布，最低剂量组死亡率呈<20%，最高剂量组死亡率>80%。

计算公式如下：

$$m = Xk - i(\sum p - 0.5)$$

$$Sm = i\sqrt{\sum \frac{pq}{n}}$$

式中：m：lg LD_{50}；

i：相邻两剂量组之对数剂量差值；

Xk：最大剂量的对数值；

q：存活率(q = 1 − p)；

$\sum p$：各剂量组死亡率总和；

n：每组动物数。

举例：小鼠经口给予某种化学毒物染毒，剂量和死亡动物数结果见下表2-2。

表2-2　某化学物质小鼠经口染毒死亡情况

组别	剂量		动物数	死亡数	死亡率	存活率	p·q
	mg/kg	对数	(n)	(只)	(p)	(q)	
1	15.0	1.1761	10	0	0.0	1.0	0.00
2	18.0	1.2561	10	2	0.2	0.8	0.16
3	21.7	1.3361	10	5	0.5	0.5	0.25
4	26.1	1.4161	10	7	0.7	0.3	0.21
5	31.3	1.4961	10	9	0.9	0.1	0.09
		i = 0.08			$\sum p$ = 2.3		

按式计算得：lg LD_{50} = 1.4961 − 0.08(2.3 − 0.5)

= 1.3521

$$Sm = 0.08\sqrt{\frac{0.16}{10} + \frac{0.25}{10} + \frac{0.21}{10} + \frac{0.09}{10}}$$

= 0.0213

lg LD_{50} 及其95%可信限为 1.3521 ± 1.96 × 0.0213 = 1.3521 ± 0.0417

所以 LD_{50} 及95%可信区间范围为22.50mg/kg(20.44～24.76mg/kg)。

2. 霍恩(Horn)法　利用剂量对数与死亡率(反应率)的转换数(即几率单位)呈直线关系而设计的方法，又称平均移动法或剂量递增法。由于该法使用动物数少，结果可直接查表求出 LD_{50} 及其95%可信限，使用甚为简便。但是，其 LD_{50} 的95%可信区间范围较大，方法精确度尚不够。

霍恩法推荐使用4个染毒剂量组，要求每组动物数相等，一般用4只或5只动物，而且剂量按等比级数排列。该方法在设计剂量时可根据化学毒物致死剂量范围的宽窄考虑

2个染毒剂量系列：

(1)系列Ⅰ：剂量组距为2.15倍，剂量系列为1×10^t、2.15×10^t、4.64×10^t……，t可以是0、1、2、3……，也可以是−1、−2、−3……(查表2-3,2-4)。

(2)系列Ⅱ：剂量组距为3.16倍，剂量系列为1×10^t、3.16×10^t、10×10^t……，t可以是0、1、2、3……，也可以是−1、−2、−3……(查表2-5,2-6)。

依据每组动物数、组距和每组动物死亡数，查表即可求出受试化学毒物的LD_{50}及其95%可信限。

3. 序贯法　又称平均数法、阶梯法或上下法。该法利用序贯设计原理，先以一个剂量进行试验，如动物死亡，则以下一个较小剂量试探，若仍死亡则以更小剂量试探；如动物存活，则以较大剂量试探，依次类推，最终求出LD_{50}。此法优点是很节省动物，一般12～14只左右动物即可完成试验。但是此法只适用于动物快速发生中毒反应及死亡的化学毒物，凡引起迟发性死亡的化学物不适用。

计算公式如下：

$$LD_{50}=\frac{1}{n}\sum xf$$

$$S=\left[\frac{n\sum x^2f-(\sum xf)^2}{n^2(n-1)}\right]^{1/2}$$

式中：n：使用动物总数；

x：每个剂量组的剂量；

f：每个剂量组使用动物数。

举例：小鼠经口给予某化学毒物染毒，以10mg/kg剂量试探，预计使用4个剂量组，剂量组距为对数值0.2(即1.58倍)，设计使用12只小鼠。结果见下表2-7。

表2-7　某化学毒物小鼠经口染毒结果(序贯法)

剂量(x)	12只小鼠反应记录												动物数		
mg/kg	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	存活	死亡	合计(f)
12.59				+				+					0	2	2
10.00			−		+		−		+				2	3	5
7.94										+		+	2	2	4
6.31													1	0	1
i 0.2													5	7	12

根据上表数据计算：$n=12$，$n^2=144$

$\sum xf=12.59\times2+10.00\times5+7.94\times4+6.31\times1=113.25$

$(\sum xf)^2=12825.56$

$\sum x^2f=12.59^2\times2+10.0^2\times5+7.94^2\times4+6.31^2\times1=1109$

$n\sum x^2f=13308$

$LD_{50}=1/12\times113.25=9.44(mg/kg)$

$$S=\left[\frac{13308-12825.56}{144(12-1)}\right]^{1/2}=0.55(mg/kg)$$

因此，该化合物小鼠经口 LD_{50} 及其 95% 可信区间范围为 9.44mg/kg（8.37～10.51mg/kg）。

4. Bliss 法 又称最大似然性法（maximum likelihood method）。我国《新药临床前毒理学研究指导原则》及《新药（西药）毒理技术要求规范》均推荐此法。Bliss 法实验设计要求不像前三种方法那么苛刻。但是，该计算比较复杂，各数值均加权后再计算，现多利用计算机软件进行运算，使复杂而困难的运算变得简单、容易且准确。在此不详述，实际应用时请参考统计学相关专业文献。

表 2-3 每组 4 只动物、组距 2.15 倍 LD_{50} 计算表

各剂量组动物死亡数（只）				剂量$_1$=0.464 剂量$_2$=1.00 剂量$_3$=2.15 剂量$_4$=4.64 ×10		剂量$_1$=1.00 剂量$_2$=2.15 剂量$_3$=4.64 剂量$_4$=10.0 $\times 10^t$		剂量$_1$=2.15 剂量$_2$=4.64 剂量$_3$=10.0 剂量$_4$=21.5 ×10	
1	2	3	4	LD_{50}	可信限	LD_{50}	可信限	LD_{50}	可信限
0	0	2	4	2.15	1.38～3.36	4.64	2.98～7.23	10.0	6.24～15.6
0	0	3	4	1.78	1.21～2.61	3.83	2.61～5.62	8.25	5.62～12.1
0	0	4	4	1.47		3.16		6.81	～
0	1	1	4	2.15	1.25～3.71	4.64	2.70～7.99	10.0	5.81～17.2
0	1	2	4	1.78	0.989～3.20	3.83	2.13～6.89	8.25	4.95～14.8
0	1	3	4	1.47	0.853～2.53	3.16	1.84～5.44	6.81	3.96～11.7
0	1	4	4	1.21	0.825～1.78	2.61	1.78～3.83	5.62	3.83～8.25
0	2	2	4	1.47	0.784～2.75	3.16	1.69～5.92	6.81	3.64～12.7
0	2	3	4	1.21	0.674～2.18	2.61	1.45～4.69	5.62	3.13～10.1
0	2	4	4	1.00	0.642～1.56	2.15	1.38～3.36	4.64	2.98～7.23
	3	3	4	1.00	0.581～1.72	2.15	1.25～3.71	4.64	2.70～7.99
1	0	2	4	2.15	1.19～3.89	4.64	2.57～8.38	10.0	5.54～18.1
1	0	3	4	1.67	0.973～2.86	3.59	2.10～6.16	7.74	4.51～13.3
1	0	4	4	1.29	0.918～1.82	2.78	1.98～3.91	5.99	4.26～8.43
1	1	1	4	2.15	1.04～4.44	4.64	2.25～9.57	10.0	4.85～20.6
1	1	2	4	1.67	0.750～3.71	3.59	1.61～8.00	7.74	3.48～17.2
1	1	3	4	1.29	0.580～2.87	2.78	1.25～6.19	5.99	2.69～13.3
1	1	4	4	1.00	0.485～2.06	2.15	1.04～4.44	4.64	2.25～9.57
1	2	2	4	1.29	0.524～3.18	2.78	1.13～6.86	5.99	2.43～14.8
1	2	3	4	1.00	0.393～2.55	2.15	0.846～5.48	4.64	1.82～11.8
2	0	2	4	2.15	0.888～5.23	4.64	1.91～11.3	10.0	4.12～24.3
2	0	3	4	1.47	0.605～3.56	3.16	1.30～7.67	6.81	2.81～16.5

续表

各剂量组动物死亡数(只)				剂量$_1$=0.464 剂量$_2$=1.00 剂量$_3$=2.15 剂量$_4$=4.64 ×10		剂量$_1$=1.00 剂量$_2$=2.15 剂量$_3$=4.64 剂量$_4$=10.0 ×10		剂量$_1$=2.15 剂量$_2$=4.64 剂量$_3$=10.0 剂量$_4$=21.5 ×10	
1	2	3	4	LD_{50}	可信限	LD_{50}	可信限	LD_{50}	可信限
2	0	4	4	1.00	0.412~2.43	2.15	0.888~5.23	4.64	1.91~11.3
2	1	1	4	2.15	0.728~6.38	4.64	1.57~13.7	10.0	3.38~29.6
2	1	2	4	1.47	0.419~5.14	3.16	0.903~11.1	6.81	1.95~23.9
2	1	3	4	1.00	0.246~4.06	2.15	0531~8.75	4.64	1.14~18.8
2	2	2	4	1.00	0.215~4.64	2.15	0464~10.0	4.64	1.00~21.5
3	0	2	4	2.15	0.366~12.7	4.64	0.789~27.3	10.0	1.70~58.9
3	0	3	4	1.00	0.114~8.77	2.15	0.246~18.9	4.64	0.529~40.7
3	1	1	4	2.15	0.246~18.9	4.04	0.529~40.7	10.00	1.14~87.7
3	1	2	4	1.00	0.0607~16.5	2.15	0.131~35.5	4.64	0.282~76.5
0	0	3	3	2.15	1.04~4.44	4.64	2.25~9.57	10.00	4.85~20.6
0	0	4	3	1.67	1.19~2.35	3.59	2.56~5.05	7.74	5.50~10.9
0	1	2	3	2.15	0.846~5.48	4.64	1.82~11.8	10.00	3.93~25.5
0	1	3	3	1.67	0.750~3.71	3.59	1.61~8.00	7.74	3.48~17.2
0	1	4	3	1.29	0.753~2.21	2.78	1.62~4.77	5.99	3.50~10.3
0	2	2	3	1.67	0.676~4.11	3.59	1.46~8.86	7.74	3.14~19.1
0	2	3	3	1.29	0.580~2.87	2.78	1.25~6.19	5.99	2.69~13.3
0	2	4	3	1.00	0.554~1.81	2.15	1.19~3.89	4.64	2.57~8.38
0	3	3	3	1.00	0.485~2.06	2.15	1.04~4.44	4.64	2.25~9.57
1	0	3	3	2.15	0.728~6.38	4.64	1.57~13.7	10.00	3.38~29.6
1	0	4	3	1.47	0.853~2.53	3.16	1.84~5.44	6.81	3.96~11.7
1	1	2	3	2.15	0.531~8.75	4.64	1.14~18.8	10.00	2.46~40.6
1	1	3	3	1.47	0.436~4.94	3.16	0.940~10.6	6.81	2.02~22.9
1	1	4	3	1.00	0.338~2.96	2.15	0.728~6.38	4.64	1.57~13.7
1	2	2	3	1.47	0.375~5.75	3.16	0.807~12.4	6.81	1.74~26.7
1	2	3	3	1.00	0.246~4.06	2.15	0.531~8.75	4.64	1.14~18.8
2	0	3	3	2.15	0.246~18.9	4.64	0.529~40.7	10.00	1.14~87.7
2	0	4	3	1.00	0.170~5.89	2.15	0.366~12.7	4.64	0.789~27.3
2	1	2	3	2.15	0.131~35.5	4.64	0.282~76.5	10.00	0.607~165

续表

各剂量组动物死亡数(只)				剂量$_1$=0.464 剂量$_2$=1.00 剂量$_3$=2.15 剂量$_4$=4.64 ×10		剂量$_1$=1.00 剂量$_2$=2.15 剂量$_3$=4.64 剂量$_4$=10.0 ×10		剂量$_1$=2.15 剂量$_2$=4.64 剂量$_3$=10.0 剂量$_4$=21.5 ×10	
1	2	3	4	LD_{50}	可信限	LD_{50}	可信限	LD_{50}	可信限
2	1	3	3	1.00	0.0607~16.5	2.15	0.131~35.5	4.64	0.282~76.5
2	2	2	3	1.00	0.0464~21.5	2.15	0.100~46.4	4.64	0.215~100
0	0	4	2	2.15	0.888~5.23	4.64	1.19~11.3	10.00	4.12~24.3
0	1	3	2	2.15	0.531~8.75	4.64	1.14~18.8	10.00	2.46~40.6
0	1	4	2	1.47	0.605~3.56	3.16	1.30~7.67	6.81	2.81~16.5
0	2	2	2	2.15	0.464~10.0	4.64	1.00~21.5	10.00	2.15~46.4
0	2	3	2	1.47	0.419~5.14	3.16	0.903~11.1	6.81	1.95~23.9
0	2	4	2	1.00	0.412~2.43	2.15	0.888~5.23	4.64	1.91~11.3
0	3	3	2	1.00	0.338~2.96	2.15	0.728~6.38	4.64	1.57~13.7
1	0	4	2	2.15	0.366~12.7	4.64	0.789~27.3	10.00	1.70~58.9
1	1	3	2	2.15	0.131~35.5	4.64	0.282~76.5	10.00	0.607~165
1	1	4	2	1.00	0.114~8.77	2.15	0.246~18.9	4.64	0.529~40.7
1	2	2	2	2.15	0.100~46.4	4.64	0.215~100	10.0	0.464~215
1	2	3	2	1.00	0.0607~16.5	2.15	0.131~35.5	4.64	0.282~76.5
0	2	3	1	2.15	0.131~35.5	4.64	0.282~76.5	10.00	0.607~165
0	2	4	1	1.00	0.170~5.89	2.15	0.366~12.7	4.64	0.789~27.3
0	3	3	1	1.00	0.114~8.77	2.15	0.246~18.9	4.64	0.529~40.7
0	1	4	1	2.15	0.246~18.9	4.64	0.529~40.7	10.00	1.14~87.7

表 2-4 每组 5 只动物、组距 2.15 倍 LD_{50} 计算表

各剂量组动物死亡数(只)				剂量$_1$=0.464 剂量$_2$=1.00 剂量$_3$=2.15 剂量$_4$=4.64 ×10		剂量$_1$=1.00 剂量$_2$=2.15 剂量$_3$=4.64 剂量$_4$=10.0 ×10		剂量$_1$=2.15 剂量$_2$=4.64 剂量$_3$=10.0 剂量$_4$=21.5 ×10	
1	2	3	4	LD_{50}	可信限	LD_{50}	可信限	LD_{50}	可信限
0	0	3	5	2.00	1.37~2.91	4.30	2.95~6.26	9.26	6.36~13.5
0	0	4	5	1.71	1.26~2.33	3.69	2.71~5.01	7.94	5.84~10.8
0	0	5	5	1.47		3.16	~	6.81	~
0	1	2	5	2.00	1.23~3.24	4.30	2.65~6.98	9.26	5.70~15.0
0	1	3	5	1.71	1.05~2.78	3.69	2.27~5.99	7.94	4.89~12.9

续表

各剂量组动物死亡数(只)				剂量₁=0.464 剂量₂=1.00 剂量₃=2.15 剂量₄=4.64 ×10		剂量₁=1.00 剂量₂=2.15 剂量₃=4.64 剂量₄=10.0 ×10		剂量₁=2.15 剂量₂=4.64 剂量₃=10.0 剂量₄=21.5 ×10	
1	2	3	4	LD_{50}	可信限	LD_{50}	可信限	LD_{50}	可信限
0	1	4	5	1.47	0.951~2.27	3.16	2.05~4.88	6.81	4.41~10.5
0	1	5	5	1.26	0.926~1.71	2.71	2.00~3.69	5.84	4.30~7.94
0	2	2	5	1.71	1.01~2.91	3.69	2.17~6.28	7.94	4.67~13.[illegible]
0	2	3	5	1.47	0.862~2.50	3.16	1.86~5.48	6.81	4.00~11.6
0	2	4	5	1.26	0.77[illegible]~2.05	2.71	1.67~4.41	5.84	3.60~9.50
0	2	5	5	1.08	[illegible].741~1.57	2.33	1.60~3.39	5.01	3.44~7.30
0	3	3	5	1.26	0.740~2.14	2.71	1.59~4.62	5.84	3.43~9.95
0	3	4	5	1.08	0.66[illegible]~1.75	2.33	1.43~3.78	5.01	3.08~8.14
1	0	3	5	1.96	1.22~3.14	4.22	2.63~6.76	9.09	5.66~14.6
1	0	4	5	1.62	1.07~2.43	3.48	2.31~5.24	7.50	4.98~11.3
1	0	5	5	1.33	1.05~1.70	2.87	2.26~3.65	6.19	4.87~7.87
1	1	2	5	1.96	1.06~3.60	4.22	2.29~7.75	9.09	4.94~16.7
1	1	3	5	1.62	0.866~3.01	3.48	1.87~6.49	7.50	4.02~14.0
1	1	4	5	1.33	0.737~2.41	2.87	1.59~5.20	6.19	3.42~11.2
1	1	5	5	1.10	0.661~1.83	2.37	1.42~3.95	5.11	3.07~8.51
1	2	2	5	1.62	0.818~3.[illegible]9	3.48	1.76~6.87	7.50	3.80~14.8
1	2	3	5	1.33	0.6[illegible]8~2.70	2.87	1.42~5.82	6.19	3.05~12.5
1	2	4	5	1.10	0.550~2.20	2.37	1.19~4.74	5.11	2.55~10.2
1	3	3	5	1.10	0.523~2.32	2.37	1.13~4.99	5.11	2.43~10.8
2	0	3	5	1.90	1.0[illegible]~3.[illegible]8	4.08	2.16~7.71	8.80	4.66~16.6
2	0	4	5	1.47	0.806~2.67	3.16	1.74~5.76	6.81	3.74~12.4
2	0	5	5	1.14	0.674~1.92	2.45	1.45~4.13	5.28	3.13~8.89
2	1	2	5	1.90	0.839~4.29	4.08	1.81~9.23	8.80	3.89~19.9
2	1	3	5	1.47	0.616~3.50	3.16	1.33~7.53	6.81	2.86~16.2
2	1	4	5	1.14	0.466~2.77	2.4[illegible]	1.00~5.98	5.28	2.16~12.9
2	2	2	5	1.47	0.573~3.76	3.16	1.24~8.10	6.81	2.66~17.4
2	2	3	5	1.14	0.406~3.18	2.4[illegible]	0.875~6.85	5.28	1.89~14.8
0	0	4	4	1.96	1.18~3.26	4.22	2.[illegible]3~7.02	9.09	5.46~15.1

续表

各剂量组动物死亡数(只)				剂量$_1$ 0.464 剂量$_2$ 1.00 剂量$_3$ 2.15 剂量$_4$ 4.64 ×10		剂量$_1$ 1.00 剂量$_2$ 2.15 剂量$_3$ 4.64 剂量$_4$ 10.0 ×10		剂量$_1$ 2.15 剂量$_2$ 4.64 剂量$_3$ 10.0 剂量$_4$ 21.5 ×10	
1	2	3	4	LD_{50}	可信限	LD_{50}	可信限	LD_{50}	可信限
0	0	5	4	1.62	1.27~2.05	3.48	2.74~4.42	7.50	5.90~9.53
0	1	3	4	1.96	0.978~3.92	4.22	2.11~8.44	9.09	4.54~18.2
0	1	4	4	1.62	0.893~2.92	3.48	1.92~6.30	7.50	4.14~13.6
0	1	5	4	1.33	0.885~2.01	2.87	1.91~4.33	6.19	4.11~9.33
0	2	2	4	1.96	0.930~4.12	4.22	2.00~8.88	9.09	4.31~19.1
0	2	3	4	1.62	0.797~3.28	3.48	1.72~7.06	7.50	3.70~15.2
0	2	4	4	1.33	0.715~2.49	2.87	1.54~5.36	6.19	3.32~11.5
0	2	5	4	1.10	0.686~1.77	2.37	1.48~3.80	5.11	3.19~8.19
0	3	3	4	1.33	0.676~2.63	2.87	1.46~5.67	6.19	3.14~12.2
0	3	4	4	1.10	0.599~2.02	2.37	1.29~4.36	5.11	2.78~9.39
1	0	4	4	1.90	0.969~3.71	4.08	2.09~7.99	8.80	4.50~17.2
1	0	5	4	1.47	1.02~2.11	3.16	2.2[illegible]~4.54	6.81	4.74~9.78
1	1	3	4	1.90	0.757~4.75	4.08	1.63~10.2	8.80	3.51~22.0
1	1	4	4	1.47	0.654~3.30	3.16	1.41~7.10	6.81	3.03~15.3
1	1	5	4	1.14	0.581~2.22	2.45	1.25~4.79	5.28	2.70~10.3
1	2	2	4	1.90	0.706~5.09	4.08	1.52~11.[illegible]	8.80	3.28~23.6
1	2	3	4	1.47	0.564~3.82	3.16	1.21~8.24	6.81	2.62~17.7
1	2	4	4	1.14	0.454~2.85	2.45	0.977~6.15	5.28	2.11~13.2
1	3	5	4	1.14	0.423~3.05	2.45	0.912~6.57	5.28	1.97~14.2
2	0	4	4	1.78	0.662~4.78	3.83	1.43~10.3	8.25	3.07~22.2
2	0	5	4	1.21	0.583~2.52	2.61	1.26~5.42	5.62	2.71~11.7
2	1	3	4	1.78	0.455~6.95	3.83	0.98[illegible]~15.0	8.25	2.11~32.3
2	1	4	4	1.21	0.327~4.48	2.61	0.705~9.66	5.62	1.52~20.8
2	2	2	4	1.78	0.410~7.72	3.83	0.883~16.6	8.25	1.90~35.8
2	2	3	4	1.21	0.266~5.52	2.61	0.573~11.9	5.62	1.23~25.6
0	0	5	3	1.90	1.12~3.20	4.08	2.42~6.89	8.80	5.22~14.8
0	1	4	3	1.90	0.777~4.63	4.08	1.67~9.97	8.80	3.60~21.5
0	1	5	3	1.47	0.806~2.67	3.16	1.74~5.76	6.81	3.74~12.4

续表

各剂量组动物死亡数(只)				剂量$_1$ 0.464, 剂量$_2$ 1.00, 剂量$_3$ 2.15, 剂量$_4$ 4.64 ×10'		剂量$_1$ 1.00, 剂量$_2$ 2.15, 剂量$_3$ 4.64, 剂量$_4$ 10.0 ×10		剂量$_1$ 2.15, 剂量$_2$ 4.64, 剂量$_3$ 10.0, 剂量$_4$ 21.5 ×10'	
1	2	3	4	LD_{50}	可信限	LD_{50}	可信限	LD_{50}	可信限
0	2	3	3	1.90	0.678~5.30	4.08	1.46~11.4	8.80	3.15~24.6
0	2	4	3	1.47	0.616~3.50	3.16	1.33~7.53	6.81	2.86~16.2
0	2	5	3	1.14	0.602~2.15	2.45	1.30~4.62	5.28	2.79~9.96
0	3	3	3	1.47	0.573~3.76	3.16	1.24~8.10	6.81	2.66~17.4
0	3	4	3	1.14	0.503~2.57	2.45	1.08~5.54	5.28	2.33~11.9
1	0	5	3	1.78	0.856~3.69	3.83	1.85~7.96	8.25	3.98~17.1
1	1	4	3	1.78	0.481~6.58	3.83	1.04~14.2	8.25	2.23~30.5
1	1	5	3	1.21	0.451~3.25	2.61	0.972~7.01	5.62	2.09~15.1
1	2	3	3	1.78	0.390~8.11	3.83	0.840~17.5	8.25	1.81~37.6
1	2	4	3	1.21	0.310~4.74	2.61	0.668~10.2	5.62	1.44~22.0
1	3	3	3	1.21	0.279~5.26	2.61	0.602~11.3	5.62	1.30~24.4

表 2-5 每组 4 只动物、组距 3.16 倍 LD_{50} 计算表

各剂量组动物死亡数(只)				剂量$_1$=0.316, 剂量$_2$ 1.00, 剂量$_3$=3.16, 剂量$_4$ 10.0 ×10		剂量$_1$=1.00, 剂量$_2$ 3.16, 剂量$_3$ 10.0, 剂量$_4$ 31.6 ×10'	
1	2	3	4	LD_{50}	可信限	LD_{50}	可信限
0	0	2	4	3.16	1.63~6.15	10.0	5.14~19.4
0	0	3	4	2.37	1.33~4.22	7.50	4.22~13.3
0	0	4	4	1.78	~	5.62	~
0	1	1	4	3.16	1.40~7.14	10.0	4.43~22.6
0	1	2	4	2.37	0.984~5.71	7.50	3.11~18.1
0	1	3	4	1.78	0.788~4.01	5.62	2.49~12.7
0	1	4	4	1.33	0.750~2.37	4.22	2.37~7.50
0	2	2	4	1.78	0.695~4.55	5.62	2.20~14.4
0	2	3	4	1.33	0.554~3.21	4.22	1.75~10.2
0	2	4	4	1.00	0.514~1.94	3.16	1.63~6.15
0	3	3	4	1.00	0.443~2.26	3.16	1.40~7.14
1	0	2	4	3.16	1.30~7.67	10.0	4.12~24.3
1	0	3	4	2.15	0.959~4.84	6.81	3.03~15.3

续表

各剂量组动物死亡数(只)				剂量$_1$=0.316 剂量$_2$=1.00 剂量$_3$=3.16 剂量$_4$=10.0 ×10		剂量$_1$=1.00 剂量$_2$=3.16 剂量$_3$=10.0 剂量$_4$=31.6 ×10'	
1	2	3	4	LD_{50}	可信限	LD_{50}	可信限
1	0	4	4	1.47	0.880～2.45	4.64	2.78～7.74
1	1	1	4	3.16	1.07～9.36	10.0	3.38～29.6
1	1	2	4	2.15	0.649～7.15	6.81	2.05～22.6
1	1	3	4	1.47	0.442～4.87	4.64	1.40～15.4
1	1	4	4	1.00	0.338～2.96	3.16	1.07～9.36
1	2	2	4	1.47	0.379～5.68	4.64	1.20～18.0
1	2	3	4	1.00	0.246～4.06	3.16	0.779～12.8
2	0	2	4	3.16	0.837～11.9	10.0	2.65～37.8
2	0	3	4	1.78	0.471～6.72	5.62	1.49～21.2
2	0	4	4	1.00	0.265～3.78	3.16	0.837～11.9
2	1	1	4	3.16	0.621～16.1	10.0	1.96～50.9
2	1	2	4	1.78	0.271～11.7	5.62	0.858～36.9
2	1	3	4	1.00	0.122～8.18	3.16	0.386～25.9
2	2	2	4	1.00	0.100～10.0	3.16	0.316～31.6
3	0	2	4	3.16	0.221～45.2	10.0	0.700～143
3	0	3	4	1.00	0.0385～26.0	3.16	0.122～82.1
3	1	1	4	3.16	0.122～82.1	10.0	0.385～260.0
3	1	2	4	1.00	0.0149～66.9	3.16	0.0472～212.0
0	0	3	3	3.16	1.07～9.36	10.0	3.38～29.6
0	0	4	3	2.15	1.29～3.59	6.81	4.08～11.4
0	1	2	3	3.16	0.779～12.8	10.0	2.46～40.6
0	1	3	3	2.15	0.649～7.15	6.81	2.05～22.6
0	1	4	3	1.47	0.654～3.30	4.64	2.07～10.4
0	2	2	3	2.15	0.556～8.34	6.81	1.76～26.4
0	2	3	3	1.47	0.442～4.87	4.64	1.40～15.4
0	2	4	3	1.00	0.412～2.43	3.16	1.30～7.67
0	3	3	3	1.00	0.338～2.96	3.16	1.07～9.36
1	0	3	3	3.16	0.621～16.1	10.0	1.96～50.9

续表

各剂量组动物死亡数(只)				剂量1=0.316 剂量2=1.00 剂量3=3.16 剂量4=10.0 } ×10		剂量1=1.00 剂量2=3.16 剂量3=10.0 剂量4=31.6 } $\times 10^t$	
1	2	3	4	LD_{50}	可信限	LD_{50}	可信限
1	0	4	3	1.78	0.788~4.01	5.62	2.49~12.7
1	1	2	3	3.16	0.386~25.9	10.0	1.22~81.8
1	1	3	3	1.78	0.288~11.0	5.62	0.911~34.7
1	1	4	3	1.00	0.196~5.09	3.16	0.621~16.1
1	2	2	3	1.78	0.229~13.8	5.62	0.725~43.6
1	2	3	3	1.00	0.122~8.18	3.16	0.386~25.9
2	0	3	3	3.16	0.122~82.1	10.0	0.385~260
2	0	4	3	1.00	0.0700~14.3	3.16	0.221~45.2
2	1	2	3	3.16	0.0472~212	10.0	0.149~669
2	1	3	3	1.00	0.0149~66.9	3.16	0.0472~212
2	2	2	3	1.00	0.0100~100	3.16	0.0316~316
0	0	4	2	3.16	0.837~11.9	10.0	2.65~37.8
0	1	3	2	3.16	0.386~25.9	10.0	1.22~81.8
0	1	4	2	1.78	0.471~6.72	5.62	1.49~21.2
0	2	2	2	3.16	0.316~31.6	10.0	1.00~100
0	2	3	2	1.78	0.271~11.7	5.62	0.858~36.9
0	2	4	2	1.00	0.265~3.78	3.16	0.837~11.9
0	3	3	2	1.00	0.196~5.09	3.16	0.621~16.1
1	0	4	2	3.16	0.221~45.2	10.0	0.700~143
1	1	3	2	3.16	0.0472~212	10.0	0.149~669
1	1	4	2	1.00	0.0385~26.0	3.16	0.122~82.1
1	2	2	2	3.16	0.0316~316	10.0	0.100~1000
1	2	3	2	1.00	0.0149~66.9	3.16	0.0472~212
0	2	3	1	3.16	0.0472~212	10.0	0.149~669
0	2	4	1	1.00	0.0700~14.3	3.16	0.221~45.2
0	3	3	1	1.00	0.0385~26.0	3.16	0.122~82.1
0	1	4	1	3.16	0.122~82.1	10.0	0.385~260

表2 6　每组5只动物、组距3.16倍 LD_{50} 计算表

各剂量组动物死亡数（只）				剂量$_1$=0.316 剂量$_2$=1.00 剂量$_3$=3.16 剂量$_4$=10.0 ×10		剂量$_1$=1.00 剂量$_2$=3.16 剂量$_3$=10.0 剂量$_4$=31.6 ×10	
1	2	3	4	LD_{50}	可信限	LD_{50}	可信限
0	0	3	5	2.82	1.60~4.95	8.91	5.07~15.7
0	0	4	5	2.24	1.41~3.55	7.08	4.47~1[illegible].2
0	0	5	5	1.78	~	[illegible].62	~
0	1	2	5	2.82	1.36~5.84	8.91	4.30~18.5
0	1	3	5	2.24	1.08~4.64	7.08	3.42~1[illegible].7
0	1	4	5	1.78	0.927~3.41	5.62	2.93~10.8
0	1	5	5	1.41	0.891~2.29	4.47	2.82~7.08
0	2	2	5	2.24	1.01~4.97	7.08	3.19~1[illegible].7
0	2	3	5	1.78	0.801~3.95	5.62	2.53~12.5
0	2	4	5	1.41	0.682~2.93	4.47	2.16~9.25
0	2	5	5	1.12	0.638~1.97	3.55	2.02~6.24
0	3	3	5	1.41	0.636~3.14	4.47	2.01~9.92
0	3	4	5	1.12	0.542~2.32	3.55	1.71~7.35
1	0	3	5	2.74	1.35~5.56	8.66	4.26~17.6
1	0	4	5	2.05	1.11~3.80	6.49	3.51~12.0
1	0	5	5	1.54	1.07~2.21	4.87	3.40~6.98
1	1	2	5	2.74	1.10~6.82	8.66	3.48~21.6
1	1	3	5	2.05	0.806~5.23	6.49	2.55~16.5
1	1	4	5	1.54	0.632~3.75	4.87	2.00~11.9
1	1	5	5	1.15	0.537~2.48	3.65	1.70~7.85
1	2	2	5	2.05	0.740~5.70	6.49	2.34~18.0
1	2	3	5	1.54	0.534~4.44	4.87	1.69~14.1
1	2	4	5	1.15	0.408~3.27	3.65	1.29~10.3
1	3	3	5	1.55	0.378~3.53	3.65	1.20~11.2
2	0	3	5	2.61	1.01~6.77	8.25	3.18~21.4
2	0	4	5	1.78	0.723~4.37	5.62	2.29~13.8
2	0	5	5	1.21	0.554~2.65	3.83	1.75~8.39
2	1	2	5	2.61	0.768~8.87	8.25	2.43~28.1

续表

各剂量组动物死亡数(只)				剂量$_1$=0.316 剂量$_2$=1.00 剂量$_3$=3.16 剂量$_4$=10.0 ×10		剂量$_1$ 1.00 剂量$_2$ 3.16 剂量$_3$ 10.0 剂量$_4$ 31.6 ×10^1	
1	2	3	4	LD_{50}	可信限	LD_{50}	可信限
2	1	3	5	1.78	0.484~6.53	5.62	1.53~20.7
2	1	4	5	1.21	0.318~4.62	3.83	1.00~14.6
2	2	2	5	1.78	0.434~7.28	5.62	1.37~23.0
2	2	3	5	1.21	0.259~5.67	3.83	0.819~17.9
0	0	4	4	2.74	1.27~5.88	8.66	4.03~18.6
0	0	5	4	2.05	1.43~2.94	6.49	4.53~9.31
0	1	3	4	2.74	0.968~7.75	8.66	3.06~24.5
0	1	4	4	2.05	0.843~5.00	6.49	2.67~15.8
0	1	5	4	1.[illegible]4	0.833~2.85	4.87	2.63~9.01
0	2	2	4	2.74	0.896~8.37	8.66	2.83~26.5
0	2	3	4	2.05	0.711~[illegible].93	6.49	2.25~18.7
0	2	4	4	1.54	0.604~3.92	4.87	1.91~12.4
0	2	5	4	1.15	0.568~2.35	3.65	1.80~7.42
0	3	3	4	1.54	0.55[illegible]~4.27	4.87	1.76~13.5
0	3	4	4	1.15	0.463~2.88	3.65	1.47~9.10
1	0	4	4	2.61	0.953~7.15	8.25	3.01~22.6
1	0	5	4	1.78	1.03~3.06	5.62	3.27~9.68
1	1	3	4	2.61	0.658~10.4	8.25	2.08~32.7
1	1	4	4	1.78	0.528~5.98	5.62	1.67~18.9
1	1	5	4	1.21	0.442~3.32	3.83	1.40~10.5
1	2	2	4	2.61	0.594~11.5	8.25	1.88~36.3
1	2	3	4	1.78	0.423~7.48	5.62	1.34~23.6
1	2	4	4	1.21	0.305~4.80	3.83	0.966~15.2
1	3	3	4	1.21	0.276~5.33	3.83	0.871~16.8
2	0	4	4	2.37	0.539~10.4	7.50	1.70~33.0
2	0	5	4	1.33	0.446~3.99	4.22	1.41~12.6
2	1	3	4	0.37	0.307~18.3	7.50	0.970~58.0
2	1	4	4	1.33	0.187~9.49	4.22	0.592~30.0

续表

各剂量组动物死亡数(只)				剂量$_1$=0.316 剂量$_2$=1.00 剂量$_3$=3.16 剂量$_4$=10.0 }×10		剂量$_1$=1.00 剂量$_2$=3.16 剂量$_3$=10.0 剂量$_4$=31.6 }×10	
1	2	3	4	LD_{50}	可信限	LD_{50}	可信限
2	2	2	4	2.37	0.262～21.4	7.50	0.830～67.8
2	2	3	4	1.33	0.137～13.0	4.22	0.433～41.0
0	0	5	3	2.61	1.19～5.71	8.25	3.77～18.1
0	1	4	3	2.61	0.684～9.95	8.25	2.16～31.5
0	1	5	3	1.78	0.723～4.37	5.62	2.29～13.8
0	2	3	3	2.61	0.558～12.2	8.25	1.76～38.6
0	2	4	3	1.78	0.484～6.73	5.62	1.53～20.7
0	2	5	3	1.21	0.467～3.14	3.83	1.48～9.94
0	3	3	3	1.78	0.434～7.28	5.62	1.37～23.0
0	3	4	3	1.21	0.356～4.12	3.83	1.13～13.0
1	0	5	3	2.37	0.793～7.10	7.50	2.51～22.4
1	1	4	3	2.37	0.333～16.9	7.50	1.05～53.4
1	1	5	3	1.33	0.303～5.87	4.22	0.958～18.6
1	2	3	3	2.37	0.244～23.1	7.50	0.771～73.0
1	2	4	3	1.33	0.172～10.3	4.22	0.545～32.6
1	3	3	3	1.33	0.148～12.1	4.22	0.467～38.1

二、经呼吸道急性毒性试验

(一) 目的

经呼吸道急性毒性试验是卫生毒理学的重要基本实验技术之一。外源性化学物经呼吸道吸入是工业毒理学和环境毒理学中最常见的接触途径之一,也是药品和农药的接触途径之一。常用于研究气态、蒸气态、气溶胶、烟尘、粉尘状的外源性化学物对呼吸道损伤、吸收后对机体损害。可求出吸入接触的半数致死浓度(LC_{50}),并进行急性毒性分级。本实习的目的是学习静式呼吸道染毒技术,掌握LC_{50}的实验步骤和方法。

(二) 原理

呼吸道吸入染毒可分为两种方式,一是动式吸入,一是静式吸入。其类型又可分为两种,一是将实验动物整体置于染毒柜中;一是只将实验动物的口鼻部位与染毒柜中含受试物的空气接触,身体其他部位置于染毒柜外,也称为面罩吸入染毒。

(三) 内容

1. 静式呼吸道吸入染毒操作。

2. 毒性体征的观察和LC_{50}计算。

(四) 试剂和材料

1. 实验动物 健康成年小鼠或大鼠若干只。

2. 器材 静式吸入染毒柜、吸管(0.2、0.5、1.0、5.0ml)、动物秤。

3. 试剂 受试物(易挥发液体,指导教师自定)、苦味酸酒精饱和液、0.5%品红溶液或其他染色剂。

(五) 操作步骤

1. 选择健康实验动物,称重,编号,随机分组。

2. 剂量分组 由指导教师确定。

3. 呼吸道吸入染毒 将小鼠放入静式染毒柜内,加盖密闭,开启小电扇。依设计剂量浓度及染毒柜体积,计算需要加入的受试物量。将液态受试物经加药孔加到接物蒸发器上,计时。记录染毒柜内温度。观察、记录中毒体征和动物死亡情况。

4. LC_{50}计算。

(六) 结果评定

依据实验动物中毒体征、死亡时间、LC_{50},参考相应的急性毒性分级标准,判断该受试物的毒性大小及其毒性特征。

(七) 实验报告

见经口急性毒性试验实习要求。

(八) 注意事项

1. 注意染毒柜密闭,保持柜内受试物浓度,防止污染周围环境和影响操作者。

2. 在染毒结束时,应在通风柜内或通风处开启染毒柜,迅速小心取出动物,分笼喂养,继续观察。

3 按规定方法销毁剩余受试物。

三、经皮肤急性毒性试验

(一) 目的

经皮染毒的方法是毒理学常用的基本技术,有些化学物与皮肤接触后可经皮吸收产生全身的中毒体征和死亡。经皮肤染毒急性毒性试验在卫生毒理学中占有重要位置。

本实习的目的是学习经皮染毒技术,掌握经皮急性毒性试验的方法。

(二) 原理

受试物穿透皮肤角质层达到真皮可被吸收入血液。虽然皮肤上有毛囊、汗腺、皮脂腺开口,但吸收的量很少,透皮吸收基本可略去不计。一般来说,研究外源化学物经皮肤吸收是指角质层完整的皮肤而言,如若表皮层破损,则化合物可经真皮直接吸收,吸收量和毒性反应将显著增加。在进行急性经皮毒性试验时,先在实验动物染毒的部位脱去被毛,但不损伤皮肤,定量涂敷受试物,观察经皮吸收后的毒性效应,求该受试物的LD_{50}。

实验多选用家兔和豚鼠,也常用大鼠代替。试验前应先进行脱毛处理。

染毒部位一般选择在动物背部中线的两侧。脱毛区为动物体表面积的10%左右。家兔约150cm^2,豚鼠、大鼠约40cm^2。体表面积(S)与体重(W)有关,可依下式求动物体表面积。

$$S = 10.4W^{0.67}$$

经皮吸收试验的剂量单位,以每千克体重接触受试物毫克数表示(mg/kg),也可使用每平方厘米体表面积接触受试物毫克数表示(mg/cm^2)。

脱毛的方法一般有化学法,用硫化钡,或机械法,用剪刀或剃刀仔细剪去被毛。脱毛

后应观察24h，确认表皮无损伤的部位，方可染毒。

（三）内容

1. 实验动物脱毛技术。

2. 经皮染毒操作。

3. 中毒体征的观察、LD_{50}计算和毒性分级。

（四）试剂和材料

1. 实验动物 健康豚鼠或家兔，也可用大鼠。体重要求一般为家兔2kg，豚鼠300g，大鼠200g左右为宜。

2. 器材 解剖剪刀、细玻璃棒、棉球、医用纱布、塑料薄膜、无刺激性胶布或网孔尼龙绷带。

3. 试剂 受试物（由指导教师自定），脱毛剂（取1份硫化钡和4份滑石粉，使用前临时用温水调成糊状。也可用1份硫化钠和4份淀粉同法调配）。

（五）操作步骤

将动物局部被毛用剪刀剪去，取脱毛剂在剪毛区均匀地涂一薄层，3～5min后，用细玻璃棒轻轻刮动去毛，并用棉球沾温水轻轻擦洗，或用温水冲洗，洗净脱毛剂。脱毛后观察24h。将动物固定，定量涂敷1mL受试物（不同剂量组需配不同浓度的受试物），再盖上医用纱布、胶布或网孔尼龙绷带加以固定，开始计时。受试物与皮肤接触4h后取下包扎，用温水洗净皮肤上的残存受试物，观察动物中毒体征和两周内死亡情况。

（六）结果评定

依据实验动物中毒体征、死亡时间、LD_{50}，参考急性毒性分级标准，判断该受试物的毒性大小和毒性特征。

（七）实验报告

见急性经口毒性试验实习要求。

第二节 局部毒性试验

外源化学物接触机体产生毒性作用的方式是多种多样的，可以根据接触受试物后产生的毒性效应的类型、部位和范围，将毒性作用分为2类：全身毒性作用和局部毒性作用。全身毒性通常是指由于毒物接触后被机体吸收而产生的全身性毒性效应；局部毒性通常是指在接触的局部所直接产生的毒性效应。如某种工业毒物，工人在车间中通过皮肤接触，所引起的头晕、恶心、心慌、神经衰弱、血压异常等变化，是全身毒性作用；而接触局部皮肤出现的红斑、皲裂、破溃等是局部毒性作用。在实际工作中，局部毒性损害大量存在，严重影响健康，是毒理学研究的重要内容。许多农药在生产和施用过程中，造成接触者皮肤和眼的刺激作用。药物可有多种给药途径，如静脉注射可造成血管的刺激，反复长期使用，可出现血管的严重损伤和炎症；肌内注射、皮下注射、直肠栓剂、滴眼液眼部给药等均可能造成局部的毒性损伤。

为了观察外源化学物的局部毒性作用，有多种局部毒性试验方法可以使用，如皮肤刺激试验、眼刺激试验、呼吸道刺激试验、肌肉刺激试验、直肠阴道刺激试验、血管刺激试验、溶血试验等等。一般来说，局部毒性试验其观察指标相对于全身毒性试验较简单。在实

际工作中经常开展的法规毒理学局部试验，观察指标通常进行肉眼和组织病理学形态检查即可，但如有需要，尤其在研究性工作中，可以设置多种观察指标。局部毒性试验在不断发展中，主要有3个方面：①观察指标的量化研究。肉眼和病理学形态检查通常为定性观察，缺乏量化。有不少学者设计改进观察方法和运用现代图像分析技术，走向半定量，甚至定量观察。②试验的规范化、标准化研究。局部毒性试验的染毒部位、染毒方法和取材等直接影响试验结果的真实性和客观性，对于试验的每个环节需规范化和标准化，其试验结果才具有可比性。③染毒专用装置的研究。局部毒性试验染毒途径变化较多，有些部位不易染毒或染毒量不易准确，有不少专用小型装置和器械出现，大大提高试验的准确性和方便性。但还嫌不足，如多次直肠给药观察局部毒性，其栓剂塞入后易滑出，需要能保持并无疼痛的无创的理想装置。

本节仅以眼刺激性试验为例，介绍局部毒性试验，其他方法可见相关章节。

眼刺激性试验

(一) 目的

观察动物眼睛接触受试物所产生的刺激反应和恢复情况。

(二) 动物及材料

1. 动物　必须用成年健康白色家兔，体重2～3kg。

2. 受试物　用制剂(膏剂或液体，均不加稀释)直接滴入或涂敷。对照组用赋形剂。

(三) 试验方法

采用同体自身对照，至少每组用家兔4只，用药前先观察并记录角膜、虹膜及结膜情况，已有病变或炎症者，剔除不用。然后将受试物0.1ml或0.1g滴入或涂入一侧眼结膜囊内，另一侧用赋形剂作为对照，给受试物后使眼睛被动闭合8～10s，观察给受试物后6h、24h、72h至7天，眼的局部反应情况，按表2-8的评分标准对角膜、虹膜及结膜分别进行评分，算出平均分值，并与同一动物的对照眼进行比较。

(四) 试验报告及结果评价

详细论述实验方法，列表记录各组各时间的角膜、虹膜及角膜的平均分值及眼刺激反应综合平均分值(即三种平均分值的总和)。然后按表2-9的评价标准，判断受试物眼的刺激性。

表2-8　眼刺激反应评分标准

眼刺激反应	分　值
角膜混浊(以最致密部位为准)	
无混浊	0
散在或弥漫性混浊，虹膜清晰可见	1
半透明区易分辨，虹膜模糊不清	2
出现灰白色半透明区，虹膜细节不清，瞳孔大小勉强看清	3
角膜不透明，由于混浊虹膜无法辨认	4
(角膜刺激最高4分)	

续表

眼刺激反应	分　值
虹膜	
正常	0
皱褶明显加深，充血、肿胀、角膜周围有轻度充血	
瞳孔对光仍有反应	1
出血、肉眼可见坏死、对光无反应（或出现其中一种反应）	2
（虹膜刺激最高 2 分）	
结膜	
A. 充血（系指睑结膜、球结膜部位的血管）	
血管正常	0
血管充血呈鲜红色	1
血管充血呈深红色，血管不易分辨	2
弥漫性充血呈紫红色	3
B. 水肿	
无水肿	0
轻度水肿	1
明显水肿，伴有部分眼睑外翻	2
水肿至眼睑近半闭合	3
水肿至眼睑超过半闭合	4
C. 分泌物	
无分泌物	0
少量分泌物	1
分泌物使眼睑和睫毛潮湿或粘着	2
分泌物使整个眼区潮湿或粘着	3
（结膜刺激最高共 10 分）	
眼刺激反应最高综合评分　16 分	

表 2-9　眼刺激性评价标准

眼刺激性综合平均分值	眼刺激性评价
0～3.9	无刺激性
4～8.9	轻度刺激性
9～12.9	中度刺激性
13～16	重度刺激性

第三节　蓄积毒性试验

（一）目的

蓄积毒性试验是评价外源化学物有无蓄积毒性的重要方法。

本实习的目的是了解蓄积毒性试验的原理、掌握蓄积系数法。

（二）原理

某些毒物多次以小剂量反复进入体内，可表现出机体对该毒物的反应性增强，即一次染毒不引起反应的剂量，如多次重复染毒，则可能引起明显的反应甚至死亡。这表明毒物有蓄积毒性。毒物的蓄积与进入机体的毒物剂量、重复染毒间隔时间、毒物的毒性及其代谢特点和机体反应特性条件有关。

（三）试剂和材料

1. 实验动物　健康成年大鼠或小鼠。

2. 器材　注射器、灌胃针、动物体重秤。

（四）实验方法

采用蓄积系数法：选用大鼠或小鼠以经口灌胃或腹腔注射方法进行试验，先进行受试物的急性毒性试验，求出 LD_{50}。然后选取相同条件的动物 40 只（或更多），随机分为试验和对照 2 组，每组至少 20 只，雌雄各半。在 1/20～1/5LD_{50}范围内选择剂量，以相同染毒途径、定时、定量对试验组染毒。观察记录动物死亡数。当试验组累积发生一半动物死亡时终止染毒。累计自实验开始到出现 50%动物死亡时的累积染毒总剂量（$\sum LD_{50[n]}$），用公式 1 计算该毒物的蓄积系数 K 值：

$$蓄积系数\ K = \frac{\sum LD_{50[n]}}{\sum LD_{50[1]}} \qquad (公式\ 1)$$

式中$\sum LD_{50}$：一次染毒的 50%的致死剂量；

　　$\sum LD_{50[n]}$：引起动物死亡的累计总剂量。

根据蓄积系数值，可将毒物的蓄积作用分 4 级（表 2-10）。

另外一种测定毒物蓄积系数的实验方法是：动物每天按体重给一定剂量的毒物染毒。第 1～4 天，给 0.1$\sum LD_{50}$剂量，然后染毒剂量按 1.5 倍每 4 天递增一次，染毒剂量安排见表 2-10。

表 2-10　按蓄积系数对蓄积作用分级

蓄积系数	分级
0～	极强蓄积
1	强蓄积
3	中等蓄积
5～	弱蓄积

表 2 10　蓄积试验染毒方案

接触天数(天)	1~4	5~8	9~12	13~16	17~20	21~24	25~28
每日接触剂量(LD_{50})	0.10	0.15	0.22	0.34	0.50	0.75	1.12
4 日接触总剂量(LD_{50})	0.40	0.60	0.90	1.36	2.00	3.00	4.48
累积接触总剂量(LD_{50})	0.40	1.00	1.90	3.26	5.26	8.26	12.74

蓄积系数的计算仍用公式 1,评价的标准仍按表 2 9。

第四节　亚慢性和慢性毒性试验

一、亚慢性毒性试验

(一) 目的

化学毒物的亚慢性毒性试验是毒理学中重要的基本技术之一,是研究化学物毒性效应的基本试验。

亚慢性毒性试验是在急性毒性试验的基础上,进一步研究多次重复染毒条件下出现的中毒体征和生化病理改变以及可能的靶器官,确定是否需要进行慢性试验,并为慢性试验设计提供依据。本实验目的为掌握亚慢性毒性试验的设计原则和主要步骤。

(二) 试剂和材料

1. 实验动物　健康大鼠或小鼠 80 只以上。非啮齿类可选用犬。

2. 器材　注射器、灌胃针、电子天平、动物体重秤、血液生化仪、血细胞计数仪、病理设备、显微镜。

(三) 操作步骤

1. 实验动物及分组　选用健康年幼的动物,小鼠体重为 16~18g,大鼠重 80~100g。各试验组动物体重均值应相近,各动物体重不应超过组平均体重的 20%。大白鼠或小白鼠,各组不少于 20 只。雌雄各半。至少设 3 个剂量组和 1 个对照组。

2. 染毒剂量及实验期限　参考急性毒性 LD_{50} 来设计剂量。

高剂量能引起动物明显中毒反应或少数动物死亡(死亡率应低于 10%),低剂量不引起任何中毒反应。实验期的长短可根据实验目的和要求来确定,一般为 1~6 个月。

3. 染毒途径　根据实验目的和毒物性质的不同,选择不同的染毒途径。如口服药物的研究常采用经口灌胃染毒法;食品毒理研究(农药和食品添加剂)常用经口喂饲染毒法;工业毒理研究(气体和挥发性液体)常用呼吸道染毒法。一些可经皮吸收的毒物,也可用经皮染毒的方法。

(1)喂饲法:将无异色、臭味的毒物均匀地拌入饲料中,让动物自由摄食。大鼠饲料时食量按体重的 10%折算。注意扣除动物弃撒在笼底的饲料量(包括毒物)。

(2)饮水法:将水溶性的无异味的毒物溶于饮水中,让动物自由饮用。

(3)灌胃法:对于给药量要求准确度较高和不宜混在饲料或水中的毒物,可以配成溶液(或混悬液),采用经口灌胃的方法。经口灌胃方法的给药量较准确,故常被采用。

(4)吸入法:对于气体或挥发性液体毒物,应采用呼吸道吸入染毒的方法。

(5)经皮染毒:某些可经皮肤吸收的毒物可用重复涂抹皮肤的方法。

4. 观察指标

(1)一般综合指标:观察动物的一般行为、体重摄食量变化、中毒体征和死亡情况。每周称体重一次,记录摄食量,计算食饲效率。

(2)血液及生化检验:常规项目包括血红蛋白、红细胞数、白细胞数、血小板数、网织红细胞数、血清酶活力(谷丙转氨酶、磷酸酶)、血清蛋白、尿素氮、非蛋白氮、肌酐含量等。此外,还应根据毒物作用特点选择其他指标。

(3)脏器重量:计算脏器系数,即某个脏器的湿重与单位体重的比值。一般实质性脏器如心、肝、脾、肺、肾等均应计算其脏器系数。

(4)病理学检查 实验结束时,处死所有动物进行大体尸检。如未见明显病变,可将高剂量组和对照组的主要脏器进行病理学检查,发现病变后再对较低剂量组相应器官组织进行检查,特别要注意肝、肾、睾丸等器官。实验过程中死亡或濒死的动物亦应进行组织病理学检查。

(四) 评价

由实验结果应得出未观察到有害作用的剂量(NOAEL)和观察到有害作用的最低剂量(LOAEL),主要中毒体征和毒作用的靶器官,为慢性实验提供资料。

二、慢性毒性试验

(一) 试验目的

经过长期、反复给予实验动物不同剂量的受试物后,观察慢性毒性效应、严重程度、靶器官和损害的可逆性。确定 NOAEL 和 LOAEL,为制定人类接触该受试物的安全限值提供科学依据。

本试验通常为毒理学安全性评价的最后阶段,试验的周期长,人力、物力、财力耗费大,影响因素多,其结果常可决定受试物的取舍。故要严格遵守良好实验室规范(GLP)和标准操作程序(SOP)进行,以保证试验的科学性与可靠性。

(二) 试剂和材料

1. 实验动物 健康初断乳大鼠 160～400 只,亦可选用犬等。

2. 器材和试剂 同亚慢性毒性实验。

(三) 操作步骤

1. 实验动物及分组 分组设 3～4 个剂量组和 1 个对照组,大鼠每组 40～100 只;犬 8～12 只;雌雄各半。其他要求基本同亚慢性实验。

2. 染毒剂量和实验期限 各组剂量一般根据亚慢性毒性试验的 NOAEL 来确定。以其 1/5～1/2 为高剂量组,1/50～1/10 为中剂量组,1/100 为低剂量组。如无亚慢性毒性试验资料,可以急性毒性试验获得的 LD_{50} 为基础进行剂量选择。即以 1/10 LD_{50} 为高剂量组,1/100 LD_{50} 为中剂量组,1/1000 LD_{50} 为低剂量组。

实验期限为 6～24 个月。

3. 染毒途径 同亚慢性毒性实验。一般与人群实际接触受试物的途径相同。为经消化道、呼吸道和皮肤染毒。

4. 指标观察与检测

(1)一般观察：至少每天对动物进行1次外观体征、行为活动和粪便形状等方面的观察。详细记录毒性效应出现时间和变化。如发现患病或濒危动物应及时隔离。对濒危或死亡动物应进行大体解剖并保存标本。

(2)体重与摄食量测定：在试验的前3个月，每周测量体重1次，以后如动物健康状况或体重等无异常改变，则每月测量一次。在试验的前3个月，每周测量摄食量，以后每2个月测量1次。

(3)临床检查

1)血液学检查：应在试验前、试验后每隔6个月及试验结束时各检查1次，项目有红细胞比积、血红蛋白含量、红细胞计数、白细胞总数、血小板计数、凝血功能等。每次每组大鼠至少检查雌、雄各10只，非啮齿类动物则全部检查。

2)生化检查：应在试验前、试验后每隔6个月及试验结束时进行。对大鼠每组每个性别随机选10只进行检查，对全部非啮齿类动物均作检查。检测项目有：血清天冬氨酸氨基转换酸、丙氨酸氨基转换酶、鸟氨酸脱羧酶、γ-谷氨酸转肽酶、碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、乳酸脱氢酶、总蛋白、清蛋白、血糖、总胆红素、BUN、尿素氮、肌酐、尿比重、尿沉淀物及钙、磷、氯、钾、钠等微量元素。

(4)系统尸检和组织病理学检查

1)大体剖检：对所有动物均应进行大体剖检。要检查动物的体表、所有器官与体腔(如腹腔与胸腔等)的外观、颜色、肿物、内容物(如胸腔积液)与手感等。对心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、甲状腺与甲状旁腺、睾丸、子宫、脑、前列腺应立即称其湿重，并计算脏器系数(脏器重/体重×100%)。对所有大体解剖可见病损的器官和组织应保存于适当的固定液中，以便进行组织病理学检查。

2)组织病理学检查：包括脑、脊髓、垂体、心、肺、肝、脾、肾、胃、胰腺、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、膀胱、肾上腺、甲状腺(连甲状旁腺)、胸腺、睾丸、附睾、前列腺、卵巢、子宫、乳腺、皮肤、肌肉、骨、淋巴结、眼球等。对照组和高剂量组动物及大体解剖时发现的异常组织均需做详尽的组织病理学检查。其他剂量组一般仅在高剂量组有异常发现时才进行检查。

(5)恢复性观察：试验结束后，每组留下部分动物继续观察2～4周，再处死检查，以了解毒效应的可逆程度及有无迟发性毒作用。在此期间除不给受试物外，其他观察内容与给受试物期相同。

(四)试验报告

应包括下列内容：实验开始和结束的时间；受试物及溶媒的理化特性、受试物的配制方法；实验动物名称、种系、数量、来源、饲养条件；动物分组情况、染毒方法、染毒剂量和染毒期限；体重与摄食量；异常体征出现时间及其发展过程；各项临床检查结果；大体解剖及组织病理学检查所见；每组动物死亡数、死亡日期、试验结束时动物存活情况；相关靶器官、毒作用性质与特点；剂量-效应关系和剂量-反应关系；LOAEL和NOAEL。

(五)结果评价与应用

根据试验所得结果，结合其他毒性实验资料，进行综合性评价。首先，应明确阳性指标的毒理学意义；其次，进一步分析与评价剂量-效应与剂量-反应关系，阐明各阳性指标之间的关系；最后，对受试物的靶器官、毒作用性质、LOAEL和NOAEL等提出明确意

见。

以本实验获得的LOAEL和NOAEL为依据，评价受试物的慢性毒性大小，从而为建立人群长期安全接触水平提供重要依据。

（六）试验中应注意的问题

1. 慢性毒性试验的目的是为制定人类接触安全限值提供依据，故受试物应为人类实际接触的产品，以免研究结果缺乏实用性。在将受试物掺入饲料或饮水时，可采用先配母料，逐步稀释的方法。饲料需经过加工、烘烤及消毒后，方可加入受试物。配好的饲料储存时间不应超过1周。

2. 合理营养　由于慢性毒性试验期限长、染毒剂量低，受试物引起的毒效应多数比较轻微、缺少特异性。因此必须防止由于营养失调造成的生长发育异常及生理、生化指标的改变，以致加重或掩盖了受试物引起的毒效应，影响正确地进行评价。

3. 在试验前要对使用的饲料及饮水进行必要的检查、测定，防止其中含有有害物质，以免影响试验结果。

4. 对观察指标严格执行质量控制，保持检测方法的稳定性和一致性。实验动物的某些行为功能、生理、生化指标随年龄增长会发生一定变化，应注意与同期的对照组进行比较。

5. 加强饲养管理，防止疾病发生。慢性毒性试验期限长，动物又处于染毒条件下，容易并发其他疾病，影响对受试物引起的毒效应的辨认。如造成疾病流行，动物大批死亡，试验将彻底失败。故防止疾病发生是试验成败的关键，必须给予足够的重视。

（肖　杭　蔡　原）

第三章

特殊毒性试验方法

第一节 致突变实验方法

一、鼠伤寒沙门菌回复突变试验

（一）目的

鼠伤寒沙门菌回复突变试验是遗传毒理学体外试验，遗传学终点是基因突变，用于检测受试物能否引起鼠伤寒沙门菌基因组碱基置换或移码突变。

（二）原理

鼠伤寒沙门菌的突变型（即组氨酸缺陷型）菌株在无组氨酸的培养基上不能生长，在有组氨酸的培养基上可以正常生长。致突变物可使沙门菌突变型回复突变为野生型（表现型），因而在无组氨酸培养基上也能生长。故可根据在无组氨酸的培养基上菌落生成数量，检查受试物是否为致突变物。对于间接致突变物，可用经多氯联苯（PCBs）诱导的大鼠肝匀浆制备的S9混合液作为代谢活化系统。

（三）仪器和试剂

1. 低温高速离心机，低温冰箱（-80℃）或液氮罐，洁净工作台，恒温培养箱，恒温水浴箱，蒸气压力锅，匀浆器等实验室常用设备。培养基成分或试剂除说明外，应是化学纯，无诱变性。避免重复高温处理，选择适当保存温度和期限。

2. 培养基制备

（1）营养肉汤培养基：牛肉膏2.5g，胰胨（或混合蛋白胨）5.0g，氯化钠2.5g，磷酸氢二钾（$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$）1.3g，加蒸馏水至500ml。加热溶解，调pH至7.4，分装后0.103 MPa 20min灭菌，4℃保存备用。

（2）营养肉汤琼脂培养基：用作基因型（rfa突变、R因子，pAQl质粒，UvrB）鉴定。琼脂粉1.5g，营养肉汤培养基100ml，加热融化后调pH为7.4，0.103 MPa 20min灭菌。

（3）底层培养基

1）磷酸盐贮备液（V B盐贮备液）：磷酸氢钠铵（$NaNH_4HPO_4$）17.5g，柠檬酸（$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$）10.0g，磷酸氢二钾（K_2HPO_4）50.0g，硫酸镁（$MgSO_4 \cdot 7H_2O$）1.0g，加蒸馏水至100ml，0.103MPa 20min灭菌，待其他试剂完全溶解后，再将硫酸镁缓慢放入其中继续溶解，否则易析出沉淀。

2）40%葡萄糖溶液：葡萄糖40.0g，加蒸馏水至100ml，0.055MPa 20min灭菌。

3)底层培养基(1.5%琼脂培养基):琼脂粉6.0g,蒸馏水400ml,融化后0.103MPa 20min灭菌。趁热(80℃),在灭菌琼脂培养基中(400ml)依次无菌操作加入:磷酸盐贮备液8ml,40%葡萄糖溶液2 ml,充分混匀,待凉至60℃左右时倒入平皿,每皿(内径90mm)25ml,37℃培养过夜以除去水分及检查有无污染。

(4)顶层培养基

1)顶层琼脂:琼脂粉3.0g,氯化钠2.5g,加蒸馏水至500ml。

2)0.5mmol/L组氨酸-生物素溶液(诱变试验用):D-生物素(分子量244)30.5mg,L-组氨酸(分子量155)17.4mg,加蒸馏水至250ml。

3. 鉴定菌株基因型用试剂

(1)0.1mol/L组氨酸-0.02mol/L D-生物素溶液(鉴定菌株用,无菌配制):称取L-盐酸组氨酸(MW191.17)191.7mg,D-生物素12.2mg,溶于10ml蒸馏水,0.103MPa 20min灭菌,保存于4℃冰箱。

(2)0.8%氨苄西林溶液(鉴定菌株用,无菌配制):称取氨苄西林40mg,用0.02mol/L氢氧化钠溶液5ml溶解,保存于4℃冰箱。

(3)0.8%四环素溶液(鉴定菌株用,无菌配制):称取40mg四环素,用0.02mol/L盐酸5ml溶解,保存于4℃冰箱。

(4)0.1%甲紫溶液(鉴定菌株用):称取甲紫10mg,溶于10ml蒸馏水。

4. 活化系统的制备

(1)大鼠肝S9的诱导和制备:选健康雄性成年SD或Wistar大白鼠,体重150g左右,周龄约5~6周。将多氯联苯(Aroclor1254)或国产PCB-五氯溶于玉米油中,浓度为200mg/kg,一次腹腔注射,5d后断头处死动物,取出肝脏称重后,用预冷的0.15mol/L KCl溶液冲洗肝脏数次。每克肝(湿重)加预冷的0.15mol/L KCl溶液3ml,连同烧杯移入冰浴中,用消毒剪刀剪碎肝脏,用匀浆器(低于4000r/min,1~2min)制成肝匀浆。以上操作需注意无菌和局部冷环境。

将制成的肝匀浆在低温(0℃~4℃)高速离心机上,以9000g离心10min。吸出上清液为S9组分,分装。最好用液氮或-80℃低温保存。S9应经无菌检查,蛋白含量测定(Lowry法),及间接致突变物鉴定其生物活性合格。

(2)S9混合液的配制

1)0.4mol/L $MgCl_2$-1.65mol/L KCl:称取 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 8.1g,KCl 12.3g加蒸馏水稀释至100ml,0.103 MPa 20min灭菌或滤菌。

2)0.2mol/L磷酸盐缓冲液(pH7.4),每500ml由以下成分组成:磷酸氢二钠(Na_2HPO_4 14.2g/500ml)440ml,磷酸二氢钠($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 13.8g/500ml)60ml,调pH至7.4,0.103MPa 20min灭菌或滤菌。

3)10%S9混合液的配制:每10ml由以下成分组成,临用时配制。

灭菌蒸馏水	3.8ml
磷酸盐缓冲液(0.2mol/L,pH7.4)	5.0ml
1.65mol/L氯化钾-0.4mol/L氯化镁溶液	0.2ml
葡萄糖-6-磷酸溶液(0.05mol/L)	40μmol
辅酶Ⅱ液(0.05mol/L)	50μmol

肝 S9 液 1.0ml

混匀，置冰浴待用。

（四）菌株及增菌培养

1. 试验菌株采用四株鼠伤寒沙门突变型菌株 TA98、TA97、TA100 和 TA102。TA97、TA98 可检测移码型致突变物，TA100 可检测碱基置换型致突变物，TA102 可检出移码突变型和碱基置换型致突变物。

2. 增菌培养 取灭菌的 25ml 三角烧瓶，加入营养肉汤 10ml，从试验菌株母板上刮取少量细菌，接种至肉汤中。37℃振荡培养 10h。存活细菌密度可达$(1\sim2)\times10^{9}$ ml。

（五）菌株鉴定和保存

4 种标准试验菌株必须进行基因型鉴定、自发回变数鉴定及对鉴别性致突变物的反应鉴定，合格后才能用于致突变试验。

1. 菌株基因型鉴定

(1)组氨酸营养缺陷鉴定(组氨酸需求试验)：取 2 个底层培养基，其中一个培养基表面涂加 0.1ml 的 0.1mol L 组氨酸-0.5mmol L 生物素溶液，另一个仅加 0.1ml 的 0.5mmol L 生物素溶液。将试验菌株在此两组培养基上划线接种，经 37℃培养 24～48h，观察生长情况。此 4 种菌株应在补充有组氨酸的培养基上生长，而在无组氨酸的培养基上不能生长。

(2)深粗糙型(rfa)鉴定(甲紫抑菌试验)：深粗糙型突变的细菌，缺失脂多糖屏障，因此分子量较大的物质能进入菌体。

鉴定方法：用移液器吸 0.1%甲紫溶液 20μl，在肉汤平板表面涂成一条带，待甲紫溶液干后，在与甲紫带方向垂直划线接种 4 种试验菌株。经 37℃培养 24～48h，观察生长情况。此 4 种菌株在甲紫溶液渗透区出现抑菌，证明试验菌株有 rfa 突变。

(3)uvrB 缺失的鉴定(紫外线敏感试验)：uvrB 缺失即切除修复系统缺失。鉴定方法：取受试菌液在营养肉汤琼脂平板上划线。用黑纸覆盖培养皿的一半，然后在 15W 的紫外线灭菌灯下，距离 33cm 照射 8s，37℃培养 24h。对紫外线敏感的三个菌株(TA97、TA98、TA100)仅在没有照射过的一半生长，而菌株 TA102 在没有照射过的一半和照射过的一半均能生长。

(4)R 因子和 pAQl 质粒的鉴定：带有 R 因子的菌株具有抗氨苄西林的特性，TA102 菌株含 pAQl 质粒具有抗四环素的特性。

用甲紫抑菌试验的方法，在两个肉汤平板上分别滴加氨苄西林溶液 20μl(浓度为 1mg/ml，溶于 0.02mol L NaOH)和四环素溶液 20μl(浓度为 0.08mg/ml，溶于 0.02mol/L HCl)，并在肉汤平板表面涂成一条带，待溶液干后，垂直划线接种 4 种试验菌株。经 37℃培养 24～48h，观察生长情况。4 个菌株生长应不受氨苄西林抑制，证明它们都带有 R 因子。TA102 菌株生长应不受四环素抑制，证明带有 pAQl 质粒。

2. 自发回变数测定 取已融化并在 45℃水浴中保温的顶层培养基一管(2ml)，加入测试菌菌液 0.05～0.2ml，迅速混匀，倒在底层培养基上，转动平皿使顶层培养基均匀分布在底层上，平放固化。37℃培养 48h 观察结果。计数回变菌落数。每株的自发回变率应落在表 3 1 所列正常范围内。

3. 对鉴别性致突变物的反应试验菌株对不同致突变物的反应不同，应该在有和没有

代谢活化的条件下鉴定各试验菌株对致突变物的反应。可按下述的点试验或平皿掺入试验的方法进行。各试验菌株对鉴别性致突变物的反应见表3 2。

4. 菌株保存 鉴定合格的菌种应加入DMSO作为冷冻保护剂,保存在－80℃或液氮(196℃),或者冰冻干燥制成干粉,4℃保存。

(六) 实验设计

受试物最低剂量为每平皿0.1μg,最高剂量为5mg,或出现沉淀的剂量,或对细菌产生最小毒性剂量。一般选用4～5个剂量,进行剂量 反应关系研究,每个剂量应做2或3个平行平皿。溶剂可选用水、二甲基亚砜(每皿不超过0.4ml)或其他溶剂。每次实验应有同时进行的阳性对照和阴性(溶剂)对照。

(七) 方法和步骤

实验方法有平板掺入法和点试法。一般先用点试法作预试验,以了解受试物对沙门菌的毒性和可能的致突变性,平板掺入法是标准试验方法。

1. 平板掺入法 在底层培养平皿上写上记号。取已融化并在45℃水浴中保温的顶层培养基一管(2ml),依次加入受试物溶液0.1ml,测试菌液0.05～0.2ml(需活化时加10%S9混合液0.5ml),迅速混匀,倒在底层培养基上,转动平皿使顶层培养基均匀分布在底层上,平放固化,37℃培养48h观察结果。

2. 点试法 在底层培养平皿上写上记号。取已融化并在45℃水浴中保温的顶层培养基两管(2ml),加人测试菌液0.05～0.2ml(需活化时加10%S9混合液0.5ml),迅速混匀,倒在底层培养基上,转动平皿使顶层培养基均匀分布在底层上,平放固化。取无菌滤纸圆片(直径6mm),小心放在已固化的顶层培养基的适当位置上,用移液器取适量受试物(如10μl),点在纸片上,或将少量固体受试物结晶加到纸上或琼脂表面,37℃培养48h观察结果。

(八) 结果与评价

1. 点试法 凡在点样纸片周围长出一圈密集的his^{+}回变菌落者,该受试物即为致突变物质。如只在平板上出现少数散在的自发回变菌落,则为阴性。如在滤纸片周围见到抑菌圈,说明受试物具有细菌毒性。

2. 掺入法 计数培养基上的回变菌落数。如在背景生长良好条件下,受试物每皿回变菌落数增加一倍以上(即回变菌落数等于或大于2乘以空白对照数),并有剂量 反应关系或至少某一测试点有重复的并有统计学意义的阳性反应,即可认为该受试物为诱变阳性。当受试物浓度达到5mg 皿仍为阴性者,可认为是阴性。

3. 报告的试验结果应是两次以上独立实验重复的结果 如果受试物对4种菌株、(加和不加S9)平皿掺入试验均得到阴性结果,可认为此受试物对鼠伤寒沙门菌无致突变性。如受试物对一种或多种菌株(加或不加S9)平皿掺入试验得到阳性结果,即认为此受试物是鼠伤寒沙门菌的致突变物。

(九) 安全措施与废弃物处理

1. 应有专门的实验室,应有良好的通风设备。

2. 试验者必须注意个人防护,尽量减少接触污染的机会。

3. 受试的致癌物与致突变物的废弃处理,原则上按放射性核素废弃物处理方法进行。

4. 所用沙门菌试验菌株一般毒性较低，具有 R 因子的危害更小。但要防止沙门菌污染动物饲养室。

表 3-1　菌株生物学特性鉴定标准、标准诊断性诱变剂、试验记录及报告格式

菌株	基因型					自发回变
	组氨酸缺陷	脂多糖屏障缺失	抗氨苄西林	抗四环素	uvrB 修复缺陷	(S9)
TA97	+	+	+		+	10～180
TA98	+	+	-	-	+	30～50
TA100	+				+	120～200
TA102	+				+	240～32

表 3-2　鉴别性致突变物在点试中试验结果

致突变物	剂量	S9	TA97	TA98	TA100	TA102
柔毛霉素	5.0μg			+		++
叠氮钠	1.0μg				++++	-
ICR 191	1.0μg		+	+	+	+++
丝裂霉素 C	2.5μg		++++	抑菌	抑菌	++
2,4,7-三硝基芴酮	0.[illegible]μg		抑菌	+++	++	+
4-硝基-O-苯撑二胺	20.0μg		++	+++	+	+++
4-硝基喹啉-N-氧化物	10.0μg			++	++	+++++
甲基磺酸甲酯	2.[illegible]μL		+		-	+++
敌克松	[illegible].0μg		+++	+++	++++	+
2-氨基芴	20.0μg	+	++	++++	+++	
甲基硝基亚硝基胍	2.0μg		+	-	+++	+++

二、哺乳动物细胞基因突变试验

目的：学习哺乳动物细胞基因突变试验(mammalian gene mutation test)的原理和观察分析方法。

细胞培养技术的进步推动着哺乳类细胞致突变研究的快速发展。在几十个基因座位上的突变并检出了突变体，包括营养需求型、细胞周期型、辐射及拟辐射物质敏感型、药物耐受性、溴尿嘧啶脱氧核苷依赖性及其他遗传机制尚未阐明的如细胞表面抗原改变等，由此建立了多种哺乳类基因突变试验系统。本实习将重点介绍常用的 L5178YTK^{+} 和 V79(CHO) HGPRT 系统。

两个测试系统的基本检测步骤大致相同。包括：①细胞制备；②毒性预试；③代谢活化；④表达期，即 DNA 突变表达及内源性酶减少；⑤选择期，即在选择剂作用下细胞集落形成；⑥细胞毒性与集落效率测试；⑦资料收集，计算突变频率、细胞毒性、集落形成率并

予以评价。不同点在于细胞培养和集落方法、表达和选择的时限。

常用细胞系简介：要提高哺乳类细胞诱变试验的敏感性，应选择合适的野生型细胞，如正二倍体或近二倍体细胞，同时需要增殖速度快、集落形成率高和培养条件低的细胞系，以缩短实验周期、降低费用。目前应用最多的细胞系特性如下：小鼠淋巴瘤 L5178Y 细胞系：源于小鼠白血病细胞，为近二倍体，细胞倍增时间为 11h，集落形成率＞70%，呈悬浮性生长。本试验使用 TK 座位杂合子细胞（$TK^{+/-}$）。中国仓鼠肺（V79）细胞株：源于中国仓鼠肺细胞，染色体数 22＋1，细胞倍增时间为 12～16h，集落形成率 75%～95%。中国仓鼠卵巢（CHO）细胞株：源于中国仓鼠卵巢细胞，染色体数为 21(2n－22)，倍增时间 12～14h，集落形成率达 88%，可贴壁或悬浮生长。

（一）小鼠淋巴瘤细胞 L5178YTK$^{+/-}$ 基因突变试验

1. 原理　在 5 三氟胸苷（TFT）参与下，通过评价细胞集落生长率来鉴定受试物诱导 L5178Y $TK^{+/-}$ 小鼠淋巴瘤细胞系正向突变能力的试验。

TK 座位位于常染色体上，其基因产物为胸腺嘧啶脱氧核苷（胸苷）激酶（TK），作用是通过磷酸化将基质中外源性的胸苷用于 DNA 合成。如果一个胸苷类似物如 TFT，存在于基质中，也可经 TK 途径磷酸化掺入 DNA 中，最终导致细胞死亡。本试验使用 TK 座位杂合子（$TK^{+/-}$）细胞，它单步正向突变就会形成 $TK^{-/-}$ 表型，失去 TK 活性，获得 TFT 抗性，既能像杂合子一样利用从头合成途径在普通培养基中生长，又能在 TFT 选择性培养基中存活，此时存活的即为自发或致突变的 $TK^{-/-}$ 集落。

2. 仪器与实验材料

(1)低温高速离心机，低温冰箱（－80℃）或液氮罐，洁净工作台，恒温培养箱，恒温水浴箱，蒸气压力锅，匀浆器，电子细胞计数器，自动集落计数器等实验室常用设备。培养基成分或试剂除说明外，应是化学纯，无致突变性。避免重复高温处理，选择适当保存温度和期限。

(2)培养基

1)生长培养基：RPMI 1640 培养基，加 10%热灭活马血清，0.05% PluronicF68，0.25mg/ml L 谷氨酸，10g/ml 丙酮酸钠，95U/ml 青霉素，95μg/ml 链霉素（均为终浓度）。

2)集落培养基：生长培养基，0.2%琼脂。

3)选择培养基：集落培养基，3μg/ml TFT。

(3)受试物与对照组的设立：本试验适用于各种受试物。固体颗粒可溶于水或有机溶剂如 DMSO、乙醇或丙酮。液体受试物可直接或经稀释后加入测试系统中。受试物配制成 100～200 倍的浓原液，以便以 1∶100～200 比例加入培养基中处理细胞。

试验必须设空白对照和溶剂对照。设加/不加 S9 的阳性对照，可选择下列试剂：甲基磺酸甲酯（MMS）：10～15μl/ml，不需代谢活化，可诱导大、小两种集落；甲基磺酸乙酯（EMS）：0.2～0.50μl/ml，不需代谢活化；3 甲基胆蒽（MCA）：1～4μg/ml，需代谢活化。也可用二甲基苯并蒽。

(4)剂量选择：首先测试受试物在水或有机溶剂中的溶解度，再用一系列浓度的受试物进行细胞毒性测定。用剂量为 1～5mg/ml（或液体 1～5ml）的受试物等倍稀释，处理细胞 4h，于次日进行活细胞计数，计算 24h 内相对于阴性对照的细胞存活率，即相对毒性。

在存活率为5%～90%的范围内选取7～10个剂量组作突变试验，以保证从狭窄剂量范围中筛选出5～6个突变剂量组。

对于毒性受试物，最高受试物浓度应使细胞存活率降至溶剂对照的10%～20%。对于致突变性低或无的受试物，试验浓度应达到5mg ml(5μ. ml，或10mmol L)，或饱和浓度。

3. 操作步骤

(1)细胞准备

1)取液氮保存的L5178YTK$^+$　鼠淋巴瘤细胞株TK$^+$　3.7.2C系，常规培养于RPMI 1640培养基中。

2)实验前，将细胞在含甲氨蝶呤(0.3μg ml)，胸苷(9μg ml)，次黄嘌呤(15μg ml)和甘氨酸(22.5μg ml)的RPMI 1640液中，37℃培养24h。用甲氨蝶呤处理以阻断从头合成途径，清除自发突变产生的TK$^+$　细胞，24h后细胞数将增加5倍。

3)将处理后的细胞在不含甲氨蝶呤的上述条件下，置37℃至少培养72h，并使细胞增至足够数目。每d进行细胞计数，作相应的稀释(约1∶4)，以保证最佳的生长率。若细胞呈团块状，可在盛9.0ml 0.1%胰酶溶液的玻管中加入1.0ml细胞培养物充分混匀，37℃培养10 min使细胞解聚，再混匀计数。

(2)诱导

1)将6×10^6细胞转入10ml 5%马血清培养基中。

2)按照预选的剂量分别加入不同浓度的受试物，同时设阴性和阳性对照。另设加入S9混合液代谢活化的阴性对照组和MCA阳性对照组，S9混合液终浓度分别为2.4mg mlNADP钠盐，4.5mg ml异柠檬酸，S910～50μl ml。

3)37℃旋转培养4h。

4)以500×g离心10min，去含受试物的上清，将细胞用新配培养液或Hanks液清洗两次，加入15ml新鲜培养液，使细胞密度约4×10^5个 ml，37℃培养2～3天，以便细胞恢复增长和诱变的TK$^+$　表型表达。

(3)筛选

1)用电子细胞计数器进行细胞计数。

2)从各剂量组分别取7×10^5细胞转入50ml半固体选择培养基，分别倒于两个直径100mm的培养皿，每皿约3.5×10^5细胞，室温冷凝。同时将细胞种入普通培养基以观察细胞形成集落的能力。

3)置5%CO_2，37℃，培养11～12天。

4)用自动集落计数器计数每皿突变体集落并测定其大小。同时计数直径为0.25～0.3mm的小集落。

计算细胞毒性和突变频率：细胞毒性＝表达期细胞悬浮生长(%)×选择期集落生长(%)

表达期细胞悬浮生长(%)为表达期处理组细胞数与阴性对照组细胞数之比。

选择期集落生长(%)为软琼脂选择培养基上处理组集落数与阴性对照组集落数之比。

$$\text{突变频率}=\frac{\text{突变细胞数}}{\text{活细胞总数}}$$

(4)试验要求

所有试验方案必须满足以下标准,其结果才可接受。±S9试验应同时进行。

1)阴性对照(溶剂与空白对照的平均值)的绝对集落形成率为(100±30)%。若为50%~70%可以接受,但需谨慎而科学地判断。低于50%不能接受。

2)阴性对照(溶剂与空白对照的平均值)的背景突变率为20~100/10^6活细胞。阳性对照的突变率范围:10~40μl/ml MMS(非活化)为200~800/10^6活细胞;4.0μg/ml MCA(活化)为200~1000/10^6活细胞。

3)只有相对集落形成率高于10%,且存活集落总数超过20的突变率可用于评价。

4)一次试验中必须有3个以上完全符合试验要求的剂量组才能进行受试物评价。

4. 结果判断　受试物组比阴性对照组的突变集落数多100个以上即可判受试物为致突变性阳性,不必考虑剂量反应关系或强行设定倍数,也没有推荐统计学处理方法。要判断一个受试物为致突变性阴性,应有阳性对照组诱发出小突变集落(直径为0.25~0.3mm)的明确证据。小集落作为突变体在L5178Y TK^{+} 鼠淋巴瘤细胞系统中有价值,因它不是由于营养耗竭所致。

Puhnan(1995)认为最低判断标准是处理组的突变率至少为背景突变率的2倍,并至少在3个剂量组观察到突变率呈剂量或毒性相关性增高;若仅在毒性接近最高的试验组突变率为背景频率的4倍以上,可认为受试物有致突变性,但若增高不到4倍,应重复试验。

若在单次试验中,应用浓度的毒性已使细胞悬浮生长率降至10%~20%,仍未观察到突变率达到背景突变率的2倍,可认为受试物无致突变性。若受试物无毒或低毒,且无溶解度限制,应用浓度应达到5mg/ml(5μl/ml)。如果重复试验未能证实第一次试验中出现的很低程度的反应,可认为受试物无致突变性。统计分析可采用方差分析或线性回归。

(二)中国仓鼠肺V79(CHO)/hGPRT基因突变试验

1. 原理　hGPRT为X连锁的功能性单倍体基因,即半合子。其基因产物是次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT),作用是酶促进次黄嘌呤和鸟嘌呤与磷酸核糖焦磷酸间的转磷酸核糖基作用,是细胞内嘌呤核苷酸合成的一条补救途径。它也可以嘌呤类似物如6-巯基嘌呤(6-MP)、6-硫代鸟嘌呤(6-TG)及6-杂氮鸟嘌呤(6-AG)为底物掺入细胞DNA中,导致细胞死亡。所以,当HGPRT座位发生突变时,细胞就表现出MP、TG与AG抗性。可用选择培养基(如6-TG)杀灭野生型细胞使突变体细胞形成集落。

2. 材料和试剂

(1)细胞:使用中国仓鼠肺(V79)细胞株,将野生型细胞接种于含次黄嘌呤及胸腺嘧啶、甲氨蝶呤、甘氨酸的MEM培养液中培养1周,使野生型细胞群中存在的自发HGPRT座位突变体选择性杀灭。然后重新接种于MEM培养液中。

(2)培养液采用MEM(Eagls)基础培养液或DMEM培养液,含10%小牛血清及适当青霉素、链霉素。

(3)磷酸缓冲液(无钙、镁、PBS),pH8.0。

(4)胰蛋白酶-EDTA溶液:胰蛋白酶浓度为0.05%,EDTA的浓度为0.02%,按等

比混合，40℃贮存。

(5)阳性对照物：可选用甲基磺酸乙酯(EMS)0.2～0.5μl mL或3-甲基胆蒽(MCA)1～4μl ml等。

(6)6 TG 0.5%碳酸氢钠溶液配成1.0mg mL，4℃贮存。

(7)大鼠肝匀浆S9混合液。

3. 操作步骤

(1)细胞准备：将5×10 个细胞接种于生长面积达25cm² 的培养瓶中，置5%～10% CO_2，37℃培养24h获得细胞密度为0.8～1.2×10⁶ 瓶的指数生长期培养物。

(2)受试物处理

1)细胞经Hanks液洗涤两次后加入5ml含不同浓度受试物的无血清培养基。同时设S9混合液代谢活化组，即加入4mL含受试物的无血清培养基后，再加入1mL S9混合液，37℃培养2.5h。

2)受试物溶剂终浓度为0.5%～1% V V。S9混合液组分的终浓度为：NADP 4mmol L；6磷酸葡萄糖5mmol L，KCl 30mmol L，MgCl 10mmol L，$CaCl_2$ 10mmol L，S9组分3mg蛋白 ml，磷酸缓冲液50mmol L(pH8.0)。

3)用Hanks液洗2～3次。再加入含血清的培养基，置5%～10% CO_2，37℃培养19～22h。

(3)表型表达与细胞毒性测定

1)将上述细胞用胰酶 EDTA液消化。待细胞脱落后放入离心管以500×g离心5～7min，弃去上清液，制成细胞悬液计数，细胞数为1×10^5，3天后分传一次，在5×10^5个细胞培养3天。

2)另将不同浓度受试物分别接种200个细胞于直径100mm培养皿中(表型表达期7～9天)，测定不同受试物处理的集落形成率。

3)细胞毒性以相对集落形成率(%)表示，即表达期处理组与阴性对照组集落数之比。

(4)突变体选择与集落形成率测定

1)表达结束后，各组取10^6个细胞分别种于不含次黄嘌呤的100mm培养皿中。细胞贴壁后加入6 TG贮存液，使TG终浓度为5～15μg ml，置5%～10% CO_2，37℃培养10天，进行突变体选择。另将各组接种200个细胞 皿于100mm培养皿中，培养7～10天作集落形成率测定。

2)相对集落形成率为各受试物组与溶剂对照组的集落形成数百分比。

3)培养结束后，用0.9%盐水洗涤细胞，再以3：1的乙醇 冰醋酸固定液固定，用Giemsa染色液或1%亚甲蓝液染色，分别计数各皿中出现的集落数。

(5)统计分析：致突变率以10^6活细胞中的突变细胞数表示，由在选择培养基中接种的细胞总数与观察到的突变集落数推算得到，以细胞相对集落形成率校正。

$$\text{致突变率}(10^6\text{活细胞数})=\frac{\text{观察到的突变集落数}}{\text{接种细胞总数}}\times\frac{1}{\text{相对集落形成数}}$$

4. 结果评价 阳性结果根据统计分析、剂量 反应关系及试验的可重复性而定。 个阳性结果必须满足：①有连续两个受试物组的突变频率出现剂量依赖性增高，且每10^6活细胞中有40个以上的突变体；②溶剂对照和空白对照的自发突变频率必须在25个突

变体 10^6 活细胞以下；③溶剂对照组和空白对照组的集落形成率高于50%。若仅在一个浓度组突变率高于40突变体 10^6 活细胞，结果不能肯定。统计分析可采用Snee和Irr数据转化，再行检验。

方法评述：①两个系统均能检测座位内的碱基置换、缺失、移码和重排等点突变，可相互替代使用。但L5178Y TK^{+} 系统还能检测包括多基因、多座位缺失等断裂剂活性，这些突变终点，包括点突变与染色体突变，可由TK 集落的大小来判断。在多种受试物处理后，TK^{+} 突变体集落将展现不同的集落大小分布，本系统中大、小突变集落的精确分布可能是致癌剂特征性诱变"指纹"。细胞遗传学和分子证据支持小集落变异体与11号染色体畸变相关的假说。一般说来，大突变集落的核型与父细胞相同，而小突变集落在11号染色体上有易于识别的染色体重排和多座位缺失。因此，L5178Y TK^{+} 系统可检测从点突变到多座位突变的遗传性损伤，并能根据诱变剂的反应构建其突变谱。②保持一个可接受的背景突变频率十分重要。可常规地向培养基中加入胸苷、次黄嘌呤、甲氨蝶呤和氨基乙酸（甘油酸）（对于L5178Y TK 细胞）；或加入次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷（对于CHO细胞）以清除自发突变的细胞。③突变表型的表达时间：细胞被诱变剂处理后，在被观察的标记基因座位中引起的DNA损伤并不能立即在细胞表现型上反映出来。只有当细胞内的正常基因产物已被突变基因产物取代时才会出现表型异常。一般认为预试选定的最佳表达时间是恒定的，对HGPRT座位为7～9天。④代谢协作效应与突变体选择时的细胞密度：代谢协作效应是指在组织培养中突变细胞的表现型被紧密接触的野生型细胞所纠正的现象，即由野生型细胞产生的代谢产物交叉饲养了突变体细胞，因此在突变体选择时，应将有代谢协作效应的野生型和突变细胞的密度控制在一定范围内。协作组推荐各试验系统的最低细胞数：L5178Y TK 3.5 $\times 10^5$ 皿；V79（CHO）HGPRT：10^6 个 处理组；AS52 XPRT：2×10^5。⑤可用受试物处理细胞4h，取 2.5×10^5 细胞铺于25ml无受试物的半固体集落培养基中，在筛选集落前让细胞繁殖4代，使细胞在39h增殖为 4×10^6。在早期，野生型细胞与突变细胞各自形成集落，在突变表型表达后需要进行筛选时，向原培养基表面加铺一层含了TFT的选择培养基层，除抑制TK活性细胞继续生长外，还可补充必需营养供集落生长。⑥试验中，受试物处理时间不宜超过2个细胞周期；S9终含量应为2%～10%；并注意控制pH值和渗透压，以免出现假阳性。

三、动物骨髓细胞染色体畸变分析

（一）目的

学习动物骨髓细胞染色体标本制作，了解动物体内染毒及染色体畸变类型。

（二）原理

染色体畸变的产生与微核的形成原理相同，观察终点不同，染色体畸变只能在细胞分裂的中期相进行观察和分析。为收集足够的中期相细胞，在收获细胞前，用秋水仙碱或乙酰甲基秋水仙碱处理，以阻断微管蛋白的聚合，抑制细胞分裂时纺锤体的形成，使分裂间期和前期的细胞停留在中期相。细胞通过低渗，使染色体均匀散开，然后固定、染色，可在油镜下观察。

（三）器材与试剂

1. 器材 小剪刀、镊子、10ml离心管、滴管、载玻片、离心机、水浴箱、生物显微镜（×100物镜）、注射器（5ml）。

2. 试剂 500mg/L 秋水仙素、0.75mol/L KCl 液；固定液甲醇 3 份冰醋酸 1 份混匀，临用时配；姬姆萨（Giemsa）储备液取 Giemsa 染料 1g，逐渐加入少许甘油在研钵中研细溶解，共加入甘油 60ml 混匀。于 60℃ 水浴中保温 2h，冷却后再加 66ml 甲醇混匀，于室温中静置 1～2 周，过滤置棕色瓶保存备用；pH6.8 磷酸盐缓冲液，取甲液 49.5ml，乙液 50.5ml 混匀即可。甲液 1/15mol/L Na_2HPO_4：称取 Na_2HPO_4 9.48g 溶于 1000ml 蒸馏水中。乙液 1/15mol/L KH_2PO_4：称取 KH_2PO_4 9.07g 溶于 1000ml 蒸馏水中。若 Na_2HPO_4 或 KH_2PO_4 含有结晶水，应重新计算称取量；环磷酰胺或丝裂霉素 C；PBS Na_2HPO_4 1.15g、NaH_2PO_4 0.2g、KCl 0.2g、NaCl 8.0g 溶于 1000ml 蒸馏水中．

（四）实验设计

1. 动物 一般选用成年大、小鼠，每组 6～10 只，最好雌雄各半。

2. 染毒与取样时间 一般染毒一次或多次，多次更为合理。研究证明即使损伤的细胞不会积累，化学物质也需在靶器官蓄积至一定的浓度才有诱变作用。一般在末次染毒后 24h 处死动物，收获细胞。

3. 剂量 选择最高剂量应达最大耐受剂量或毒物的 30%～80% LD_{50} 剂量。低毒物质应以最大给药量或大于人使用剂量的 50～100 倍。一般设 3～5 个剂量组，剂量跨度在 10^2～10^3 或更大。阴性对照组给予溶剂；阳性对照组给予 30～50mg/kg 环磷酰胺，经腹腔注射 1 或 2 次。

4. 给药途径 尽量采用受试物进入机体途径，或根据毒物的性质、研究目的而定，一般采用经口、皮、呼吸道或腹腔等。

（五）操作步骤

1. 收获细胞 处死动物前 2～4h，腹腔注射秋水仙素，小鼠剂量为 4mg/kg，大鼠剂量为 1mg/kg。小鼠用颈椎脱臼法处死动物，大鼠用动静脉放血法处死动物，迅速取出双侧股骨，去肌肉，擦净血污，剪开两端关节面，用注射器吸 PBS 液 5ml 冲出骨髓于离心管中，用 1500r/min 离心 10min，去上清液。

2. 低渗 打散沉淀物，加入预温 37℃ 的 0.075mol/L KCl 约 6ml，混匀，于 37℃ 低渗 15～20min，再加固定液 1～2ml 混匀，立即于 1000r/min 离心 10min，弃上清液。

3. 固定 使细胞重新悬浮，加入固定液 4ml 混匀，放置室温 10～20min，然后 1000r/min 离心 10min，去上清液。同样方法再固定一次，去上清液，留约 0.5ml。

4. 制片 染色使细胞悬浮，将细胞悬液滴于冰冻的载玻片上，干燥，用 10% Giemsa 染色液染色 10～20min，取出清洗自然干。

5. 阅片 在低倍镜下选择分散良好，细胞未破裂的中期分裂相，观察并记录染色体结构异常和数目异常细胞。

（六）结果分析与评价

以每只动物为观察单位，每只动物观察 100 个中期分裂相，计算其畸变细胞率，阴性和阳性对照组的畸变率应与所用动物的种属及有关资料相符。实验结果的数据可用泊松分布、二项分布、Dunnet、*t* 检验、X^2 检验等多种统计方法分析，所得结果是相同的。各实验组畸变细胞率与阴性对照组相比较，差别有显著性意义，并有剂量反应关系，或某一剂量组呈现可重复的并有统计学意义的增加，则此受试物的小鼠骨髓染色体畸变实验阳性。

（七）注意事项

低渗是本实验的关键，控制好低渗时间，做出分散良好的染色体标本，关系到实验结果的准确性。

四、小鼠骨髓细胞微核试验

(一) 目的

通过本次实验，学习和掌握小鼠骨髓多染红细胞(PCE)微核测定方法。

(二) 原理

微核试验是用于染色体损伤和干扰细胞有丝分裂的化学毒物的快速检测方法。微核是指存在于细胞中主核之外的一种颗粒，大小相当于细胞直径的1/20～1/5，呈圆形或杏仁状，其染色与细胞核一致，在间期细胞中可以出现一个或多个。一般认为微核是细胞内染色体断裂或纺锤丝受影响而在细胞有丝分裂后期滞留在细胞核外的遗传物质。所以，微核试验能检测化学毒物或物理因素诱导产生的染色体完整性改变和染色体分离改变这两种遗传学终点。

微核可以出现在多种细胞中，但在有核细胞中较难与正常核的分叶及核突出物相区别。由于红细胞在成熟之前最后一次分离后数小时可将主核排出，而仍保留微核于PCE细胞中，因此通常计数PCE细胞中的微核。

(三) 器材与试剂

1. 器材 手术刀、手术剪、无齿镊、小型弯止血钳、干净纱布、带橡皮头吸管、台式离心机、刻度离心管、晾片架、电吹风机、玻璃蜡笔、玻璃染色缸、2ml注射器及针头、载玻片及推片、定时钟、带油镜头显微镜、细胞计数器。

2. 试剂 甲醇(分析纯)、甘油(分析纯)、小牛血清、生理盐水、Giemsa储备液(取Giemsa染料1g，甘油66ml，甲醇60ml。先将染料置于研钵内，加入少量甘油混合研细，再分次倾入剩余的甘油继续研磨，然后转移至烧杯内，盖上玻璃表面皿，置60℃水浴2h，取出待冷却后加入甲醇，混合静置2周后，过滤于棕色瓶内，存放阴凉处。该储备液存放的时间越长，染色效果越好。临用时用pH6.8的磷酸盐缓冲液配制为10%的应用液)、pH 6.8的磷酸盐缓冲液。

(1) 1/15mol/L磷酸二氢钾(KH_2PO_4)溶液：称取分析纯KH_2PO_4 9.06g，用蒸馏水溶解并定容至1000ml。

(2) 1/15mol/L磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)溶液：称取分析纯Na_2HPO_4 9.45g(或$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 11.87g；$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 17.87g；$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 23.88g)用蒸馏水溶解并定容至1000ml。

(3) pH6.8的磷酸盐缓冲液：取1/15mol/L的磷酸二氢钾溶液50.40 ml和1/15mol/L的磷酸氢二钠溶液49.60ml，两者混合均匀即成。

3. 阳性对照物 环磷酰胺或丝裂霉素C。

(四) 操作步骤

1. 试验动物及处理

(1)动物选择：一般常用的试验动物为大、小鼠。以小鼠使用最为广泛，要求体重18～20g，7～12周龄。每组小鼠数量10只，雌雄各半。

(2)染毒途径：根据研究目的或受试化学毒物性质的不同，可分别选用经口、经皮、经

呼吸道及注射等染毒途径。但原则上应尽可能采用与人体接触化学毒物相同的途径。

(3)染毒次数及取样时间:研究证实化学毒物需在靶器官内蓄积至一定的浓度才具有致突变作用,不同化学毒物诱发微核出现的高峰时间也不尽相同。波动范围可以达到24～72h。这就要求在接触化学毒物后设立不同的采样时间点。考虑到以上两方面的原因,建议采用多次染毒的方法。其中以4次染毒比较方便合理。即每天染毒一次,连续4天,第5天取样。这样,取样一次就能覆盖24～72h高峰,如果高峰延迟到96h也不会漏掉。

(4)剂量选择:受试化学毒物的最大剂量除受溶解度大小所限外,应达到最大耐受量。一般情况下,应设3～5个或更多剂量组,剂量覆盖的范围要达到3个数量级以上。同时还应设立阳性对照组和阴性对照组。阳性对照组可用环磷酰胺(50～100mg/kg)或丝裂霉素C(10mg/kg)腹腔注射1次或2次。阴性对照组使用等体积的溶剂。

2. 骨髓液的制备和涂片　试验动物最后一次染毒后,按确定的时间用颈椎脱臼或麻醉的方法将其处死,四肢固定于解剖板,将腹中线被毛浸湿,剖开胸腹部,取下胸骨,擦净血污,剔去肌肉,剪去骨骺,用小型弯止血钳将骨髓挤于有一滴小牛血清的清洁载玻片上,混合均匀后推片。也可在动物处死后,迅速用手术剪将其两腿股骨取下,剔去肌肉,用生理盐水洗去血污和碎肉,剪去两端的骨骺,用带针头的2ml注射器吸取小牛血清,插入骨髓腔内,将骨髓冲入离心管,然后用吸管吹打骨髓团块使其均匀,以1000r/min离心10min,弃去多余的上清液,留下约0.5ml与沉淀物混匀后,用滴管吸取并滴一滴在清洁的载玻片上,推片。阳性及阴性对照组按上述方法同时进行处理。

3. 固定　将推好晾干的骨髓片放入染色缸中,用甲醇溶液固定15min,取出晾干。不能及时染色的涂片也应固定后保存。

4. 染色　将固定晾干后的涂片,用新鲜配制的Giemsa应用液(Giemsa储备液1份加pH6.8的磷酸盐缓冲液9份)染色10～15min,然后冲洗掉玻片上的染色液,置晾片架上晾干。

5. 观察计数　先在低倍镜下进行观察,选择分布均匀,染色较好的区域,再在油镜下观察计数,PCE细胞呈灰蓝色,正染红细胞(NCE)呈橘黄色。细胞中含有的微核多数呈圆形,边缘光滑整齐,嗜色性与核质一致,呈紫红色或蓝紫色。一个细胞内可出现一个或多个微核。计数1000个PCE中含微核的PCE数,并且计数200个细胞中PCE与NCE的比值。

(五) 结果分析与评价

本试验中只计数PCE中的微核,微核率以千分率表示。每只动物为一观察单位。每组的雌、雄动物分别计算微核PCE的均值。雌、雄动物之间无明显的性别差异时可合并计算结果,否则应分别进行计算;正常的PCE/NCE比值约为1(正常范围为0.6～1.2)。如比值<0.1,则表示PCE形成受到严重抑制,受试化学毒物的剂量过大,试验结果不可靠。阴性对照组和阳性对照组的微核发生率,应与试验所用动物种属及品系的文献报道结果或者是与研究的历史数据相一致。

微核试验所获数据资料的频数分布尚无定论,多种统计学方法(如泊松分布、二项分布、X^2检验等)均有人用于试验结果的统计分析。该试验的关键步骤是制作良好的骨髓涂片及优质的染色。

五、单细胞凝胶电泳技术

(一) 目的

通过本次实验，学习和掌握单细胞凝胶电泳技术测定方法。

(二) 原理

本方法采用碱性凝胶电泳技术，可显示碱性不稳定位点和明显断裂，用溴化乙锭(EB)染色，在荧光显微镜下即可观察。由于受损细胞在电泳时，其DNA从核中向阳极伸展形成一个亮的荧光头部和后部，形似彗星，又得名彗星试验(Comet assay)。一般认为，DNA双链以组蛋白为核心盘旋形成核小体，在核小体中DNA为负超螺旋结构，如果有去污剂进入细胞，核蛋白被浓盐提取，DNA便形成残留的类核，如果类核中DNA断裂，就会在核外形成一个DNA晕轮，DNA断裂将引起超螺旋松散，电泳时DNA断片向阳极伸展，形成特征性彗星尾。因此，决定断裂DNA电泳行为的关键因素是DNA超螺旋的松散。DNA受损越严重，含断裂片段越多，在彗星尾中出现的DNA就越多。尾中DNA的百分含量和尾长是DNA断裂的重要定量参数。

(三) 器材与试剂

1. 器材　全磨砂Dakin载玻片、微量吸管和吸头、1号盖玻片(24mm×50mm)、正常熔点琼脂糖(MNA)、玻片托盘、低熔点琼脂糖(LMA)、冰盒、液体闪烁管、微量离心管、显微镜。

2. 试剂　二甲亚砜(DMSO)、NaCl、NaOH、Na_2 EDTA、溴化乙锭(EB)、Triton X-100、无Ca^{2+}、Mg^{2+} Hank's平衡盐溶液(HBSS)、Tris、无Ca^{2+}、Mg^{2+}磷酸盐缓冲液(PBS)、肌氨酸钠。

HBSS溶液(含20mmol/L EDTA、无Ca^{2+}、Mg^{2+})：HBSS溶液400ml，EDTA 3.72g，调pH至7.0～7.5，定容至1000ml，贮存4℃。

细胞消化液(每1000ml)：2.5mol/L NaCl 146.1g，100mmol/L EDTA 37.2g，10mmol/L Tris 1.2g(用约12g NaOH调至pH为10)，1%肌氨酸钠10g，用去离子水定容至890ml。过滤除菌，为贮备液。室温保存。应用液：加新配1% Triton X-100和10% DMSO。在应用前冷藏30～60min。加DMSO是清除血液或动物组织中血红蛋白释放的铁产生的自由基。

电泳缓冲液贮备液：① 10mol/L NaOH(200g/500ml去离子水)(2周内用)；②200mmol/L EDTA(14.89g/200ml去离子水，pH＝10)室温保存。

电泳缓冲液应用液(300mmol/L NaOH/1mmol/L EDTA)(缓冲液)：10mol/L NaOH 30.0ml，200mmol/L EDTA 5.0ml，定容至1000ml，混匀。电泳前新鲜配制。

中和缓冲液(0.4mol/L Tris)：Tris 48.5g，去离子水定容至1000ml，用＞10mol/L HCl调pH至7.5。室温贮存。

溴化乙锭(EB)染色液(10×贮备液，即20μg/ml)：溴化乙锭1mg，去离子水50ml，室温贮存。临用时将贮备液稀释10倍。EB为诱变剂，小心操作。

(四) 操作步骤

试验流程：受试物处理细胞→铺细胞于微胶→裂解细胞→电泳→EB染色→镜检。

1. 单细胞悬液的制备　常用的细胞分离和培养方法如下：

(1)全血:将 5μl 全血与 75μl LMA 相混合。按后述步骤进行试验。亦可将 5μl 血加入 1ml 介质,冷藏待分析。分析时,将细胞离心,尽可能弃去所有上清液,再加 75μl LMA。

(2)分离淋巴细胞:在微量离心管中,将 20μl 全血与 1ml RPMI 1640 混合。在血培养基混合物下加 100μl Ficol,在 2000×g 离心 3min。弃去 100μl 介质底层和 Ficol 顶层。加 1ml 培养基混合,离心 3min 以使淋巴细胞沉积。弃去上清液,重新加入 75ml LMA 混悬沉积的淋巴细胞,按后述步骤进行试验。

(3)骨髓:用 1ml 含 20mmol/L EDTA 的冷 HBSS 冲洗小鼠股骨骨髓于微量离心管中。取冲洗液 5μl 与 75μlLMA 混合,按后述步骤进行试验。

(4)固体组织:取一小块组织,放入 1～2ml 含 20mmol/L EDTA 的冷 HBSS 中。切碎,静置数分钟。取 5～10 μl 细胞悬液与 75μl LMA 混合,按后述步骤进行试验。

与 75μl LMA 混合的细胞悬液的量应小于 10μl,而每玻片最适细胞数约为 10000 个细胞。要确定最适细胞的密度,可取 5μl 细胞悬液在相差显微镜下进行细胞计数或取 5μl 细胞悬液与 75μl PBS 混合,滴于普通玻片上,盖上相同大小的盖玻片计数细胞。对于含血量丰富的组织,如肝脏,先切碎成稍大的组织块,静置,吸弃 HBSS,加入新的 HBSS,再切成细小的组织块,取 5 μl 细胞悬液与 75μl LMA 混合,按后述步骤进行试验。

(5)体外组织培养:单层培养:用特孚隆刮片刮(scrape)少许细胞到细胞培养皿的培养基中,使之含有大约 1×10^6 细胞/ml。取 5μl 细胞悬液加入 75μl LMA 中。按后述步骤进行试验。

悬浮培养:取约 10000 个细胞(应少于 10μl)到 75μlLMA 中混合。按后述步骤进行试验。

2. 试验分组与染毒 体内试验,至少应设 3 个剂量组、1 个阳性对照组和 1 个阴性对照组,每组至少 4 只动物,人体取样应设 2 个平行样。体外试验,至少应设 3 个剂量组、1 个阳性对照组和 1 个阴性对照组,每组至少 2 个平行皿。

在体外试验中,可直接将受试物加入到生长培养基中,也可对包埋于琼脂糖中的细胞进行染毒。染毒后可直接检测 DNA 损伤,也可置 37℃培养一段时间,以检测 DNA 修复情况,但在 37℃的标准琼脂糖中培养正常淋巴细胞 1h 可能会导致彗星形成。在体内试验中,可经适当途径给予动物受试物(1～72h),再取出所需的组织细胞,检测其活力,立即进行 SCGE 检测。这种方法已经用于毒物动力学研究,如吸入染毒后采集呼吸道细胞,经口染毒后采集消化道细胞。

3. 制片

(1)分别取 125mg LMA 和 NMA 溶于 25ml PBS,可稍加热使其充分溶解,制备成 0.5%LMA 和 0.5%NMA。

(2)取 10μl 保存在 45℃的 0.5%NMA 浇注到全磨砂 Dakin 载玻片上,迅速盖上 1 号盖玻片,当心勿使产生小气泡,置室温 1～2min 使琼脂糖凝固。此层主要作用是保证第二层和第三层平整及附着紧密。NMA 的量不必太精确,但要铺平整和均一。

(3)将约 10000 个悬于 5～10μl PBS 中的处理组或对照组细胞与 75 μl 0.5%LMA (37℃)相混合。

(4)轻轻地将盖玻片移开,迅速将细胞混悬液加到第一层琼脂糖上,盖上新盖玻片让

其均匀铺开，将玻片置冰盒上的玻片托盘中 3～5min 使琼脂糖固化。在 24mm×50mm 的面积上加 10000 个细胞，相当于在放大 250×的显微镜下每视野 1 个细胞。

(5)轻轻移开盖玻片，将 75μl 0.5%LMA(37℃)作为第三层加上，放回玻片托盘中待琼脂糖凝固。

(6)移开盖玻片，将载玻片缓慢浸入新配制的冰凉的细胞消化液中，置 4℃冷藏至少 1h。可在细胞消化液中至少保存 4 周，但时间太长可能会引起缓冲液沉淀。

以上用量系依据 24mm×50mm 玻片，实际用量可随玻片大小改变。如果凝胶与玻片附着不紧，可将第一层的 NMA 浓度调至 0.65%左右。以上 3～6 步应在黄、红色灯光下或暗处进行，以免 DNA 受到额外损伤。

4. 电泳

(1)将冷藏 1h 后的载玻片从细胞消化液中轻轻取出，并列置于水平凝胶电泳槽中阳极端附近，玻片间不留空隙。

(2)向电泳槽中加入新配制的电泳缓冲液应用液，使液面完全覆盖载玻片。应防止在琼脂糖上产生气泡。

(3) 玻片在碱性缓冲液中放置 20～60min，让 DNA 在电泳前解螺旋和产生碱性易损性损伤。时间越长，损伤表现得越充分。

(4) 室温下置电压 25V，调整电泳槽中缓冲液面高度使电流为 300mA，根据研究目的和对照样品的迁移情况，电泳 10～40min。不同类型的细胞电泳时间不同。

(5) 切断电源，将玻片置染缸，用中性缓冲液浸洗，每次 5min。晾干，重复两次。目的是防止碱液和去污剂干扰 EB 染色。

(6)呈中性后，晾干玻片，将玻片用 50μl EB 应用液染色，盖上新盖玻片。以上 1～4 步应在黄、红色灯光下或暗处进行，以免额外 DNA 损伤。玻片可在潮湿环境中保存 72h，但最好在 24h 内读片。

5. 镜检及结果评价　EB 染色后的 DNA 样品应尽快在荧光显微镜下观察。未受损细胞表现为一圆形荧光核心，即彗星头部，没有尾巴。而受损细胞则有彗星尾从核中伸向阳极，形成一个亮的荧光头部和尾部。

用目镜测微尺测定或拍摄×400 黑白显微照片再作测定。每个样品中至少随机挑选 25 个细胞测定。测定受试组和对照组核 DNA 直径和 DNA 迁移(即彗星尾)长度，再用透明尺测彗星迁移部分的面积。也可测其斜度和峭度，因不同受试物引起的彗星形状可有差异。统计时，比较受试组和对照组之间彗星尾长，或计算受试组(T)与对照组(C)彗星尾长之差(T－C)，即 T－C＜10μm(－)；10～20(＋)；20～40(＋)；＞40μm(＋＋)。另外，也可计算各组受损细胞率(%)，即彗星尾长＜35μm 为未损伤；35～70μm 为中度损伤；＞70μm 为重度损伤，此值在不同细胞稍有差异。因它是强行设定界线将结果分为阴性或阳性，不属于正态和单模型分布，故不宜用参数或非参数检验，而应用响应或非响应混合评价(即用 Lehman 转换打分方法)。如果要得到剂量-反应关系，不宜用彗星长度，而最好用面积或局部荧光强度作判断。有条件者可借助自动数字图像处理系统作大规模分析。它能提供全范围密度及几何参数，描述彗星整体和头尾各部的特征。有多种图像分析仪可进行 SCGE 数据定量，如英国利物浦 Confocal Comet 公司的彗星分析系统，它将分析仪与 CCD 照相机相连，用以定量 DNA 迁移长度及 DNA 迁移的百分数。

（五）SCGE 检测技术评价

单细胞凝胶电泳技术是一种检测单个哺乳类细胞 DNA 断裂的新技术，它简便、快速和灵敏，与以往的碱性蔗糖沉降试验和碱性解链试验等相比具有明显的优势：可检测各种组织细胞；所需样品细胞数目少（<1,000 个）；检测时间短，数小时即可出结果；花费甚少。SCGE 已被用于检测受试物对哺乳类细胞 DNA 损伤和修复的各种体内外试验，其检测 DNA 断裂的特性使它能广泛地用于理化因素，包括自由基诱导的 DNA 损伤与修复的研究；作为生物标记进行生物监测及流行病学研究；遗传毒理学研究；肿瘤治疗方面的研究。

彗星试验在 DNA 切除修复研究中尤为有用，而切除修复在人类 DNA 损伤修复中占主要地位，利用它可进行从损伤到切除修复、合成、连接的单步骤各时点的观察；同时，除完整细胞外，它可用于渗透性细胞的研究，后者的核、外来蛋白、抑制物、脱氧核苷酸等渗透，便于探讨 DNA 修复的分子机制。SCGE 可能是快速诊断干皮病（XP）的好方法，并可用于在修复缺陷型细胞中研究 DNA 的损伤与修复。

在流行病学研究中，人们越来越重视生物学标记，血红蛋白和 DNA 加合物、DNA 损伤（碱性和中性洗脱）和人类淋巴细胞遗传学终点（染色体畸变分析、微核试验、SCE），都已被用做生物学标记。可是，DNA 加合物的检测不能提供 DNA 损伤在各种细胞的分布；生化方法不能提供单个细胞中 DNA 损伤情况；细胞遗传学方法不能在单个细胞水平进行检测，且往往限于增殖细胞，尤其是外周淋巴细胞。而 SCGE 技术则超越了这些方面，并且相对简便、快速、对各种理化因素都较敏感，需样品量少（10～20μl 血样即可），适合于各种细胞类型的体内外检测，花费少，因此非常适合于接触遗传性有害因素人群的生物监测，并可用于筛检对 DNA 损伤因素敏感的高危人群。SCGE 检验还适用于环境污染物接触对鱼类 DNA 损伤的监测。

（石　年）

第二节　致癌试验

化学物质致癌性的判别往往包含定性评价和定量评价两个方面，前者是确定化学物质能否致癌，后者进行剂量反应关系分析，以推算可接受的危险度的剂量，或人体实际可能接触剂量下的危险度。

由于肿瘤发生是一种后果严重的毒效应，因此致癌性判别是一项极其重要、慎重而又复杂的工作。要对一种外源化学物进行致癌性判别，要求有设计严谨、质控严格的一系列实验证据，尤其是可靠的流行病学调查才能判定对人的致癌性。限于节约时间、人力、物力的原因，一般在进行长期动物诱癌试验前，先进行致突变试验、恶性转化试验和短期致癌试验和（或）中期致癌实验，据此对该化学物的致癌性进行初步推测；在此基础上，进一步开展动物长期诱癌试验，并最好结合人群流行病学研究资料，才能对化学物的致癌性作出评价。

根据肿瘤发生的体细胞突变学说，可采用配套的致突变试验对化学物是否具有致癌性进行初筛。现行的大多数短期试验用原核生物、低等真核生物、哺乳动物细胞和低等小

动物中明确的遗传毒性标记为终点。按其所用终点可将这些短期试验分为三类(IERC)：第一类为DNA损伤试验，包括与DNA的共价结合诱发DNA断裂或修复、诱导细菌的噬菌体以及能修复和不能修复DNA的成对细菌株的不同存活能力等，如细菌DNA修复试验、程序外DNA合成试验、碱性凝胶电泳技术。第二类是基因突变试验，检测遗传类型或表型的可遗传性变化，包括检出一个基因产物的选择或改变，检测由于正向或逆向突变而致的生物功能改变，以及检测基因的重组或改变(包括核基因组、线粒体基因组和含有病毒或质粒的基因组)，如Ames试验、大肠杆菌回变试验、哺乳动物细胞正向突变试验、小鼠特异基因座试验等。第三类为染色体效应试验，包括检测染色体数目和结构改变、姐妹染色单体交换(SCE)、微核和显性致死突变等。

需要注意的是：致突变试验仅能对化学物的遗传毒性进行检测，但对非遗传毒性致癌物无法检测出来。如果筛选试验阳性的化学物，可能是具有遗传毒性的致癌物，但也可能是具有遗传毒性的非致癌物；如果筛选结果为阴性的致癌物，则可能是非遗传毒性的非致癌物，也可能是非遗传毒性的致癌物。另外，各种致癌物以不同的方式影响生物体的遗传物质，因此可能在某项试验中阳性的化合物在另一项试验中结果呈阴性，因此应针对不同的测试对象和目的，根据每项致突变试验的敏感性、特异性、准确性等，从每一遗传学终点选择一个试验组合成一组试验初步筛选和预测化学物是否具有致癌性。

有关短期筛检试验方法，本章第一节已作详细描述，本章重点介绍另三类致癌试验。

一、哺乳动物细胞体外恶性转化试验

哺乳动物细胞体外恶性转化试验是指利用培养的哺乳动物细胞接触化学物后，观察细胞转化为癌细胞的试验。其主要目的是了解化学物质能否使体外培养的细胞生长自控能力丧失。本试验的观察终点是恶性变的细胞。实验中观察细胞生长过程的变化，包括细胞形态、细胞生长力、生化特性、细胞间接触抑制等变化，以及将细胞移植于动物体内能形成肿瘤的能力。

生长自控能力表现为细胞之间接触抑制，因此，正常的培养细胞能粘附培养瓶壁生长为一层的单层细胞，而且细胞排列整齐有序。转化为恶性的细胞生长呈多层细胞重叠，且细胞排列紊乱。

试验过程同时可观察细胞形态发生相应的变化：恶性转化细胞偏大、大小不等；细胞核大、变形、染色质深染且粗糙、核浆比例倒置、核仁增生或肥大，核分裂象多见。核仁和胞浆在HE染色呈嗜碱性染色，呈现蓝染的细胞浆。

恶性转化试验常用的细胞种类有：①叙利亚仓鼠胚胎细胞(SHE细胞)和人体纤维细胞等原代或早代细胞；②BALB/C-3T3、C3H/10T1/2和BHK-21细胞系；③RLV/RE细胞系(即劳舍尔白血病病毒感染的Fisher大鼠胚胎细胞)和SA7/SHE细胞系(即猿猴腺病毒感染的SHE细胞)。下面，以BALB/C 3T3细胞的恶性转化试验为例说明：

(一) 原理

某些合适的细胞在离体培养情况下若用化学致癌物处理，可产生异常的表型和形态改变，成为转化细胞，因此采用这样的试验(称为细胞转化试验)能够半定量地评价某一种受检化学物的潜在致癌能力。

BALB/3T3小鼠细胞在培养中能形成单细胞层(具有接触抑制能力)，若将这些细胞

注射到同系裸鼠皮下,不会产生肿瘤。若这些单层生长细胞用化学致癌物处理产生转化细胞灶,将转化细胞注射至同系裸鼠皮下,则可产生肿瘤。因此,只要观察受检物处理的单层细胞是否出现转化细胞灶及其数量,并与对照组比较,即可判断受检物潜在的致癌能力。

(二) 操作步骤

1. 细胞　选择自发转化频率低的克隆,贮存于液氮中,经常检查,保证无支原体污染。细胞培养液为DMEM(含10%小牛血清)。

2. 分组　阴性对照组除不加受检物外均同受检物试验组。阳性对照组采用已知致癌物(如MCA,剂量5μg/ml)代替受检物。固体受检物若不溶于培养液,可用二甲亚砜助溶(二甲亚砜在培养液中浓度不超过1%),这时需设置溶剂对照组。

3. 受检物剂量选择　从1mg/ml(或1μg/ml)作为最高剂量开始,按2倍稀释法递减15个剂量水平,每个剂量用3个培养皿,接种200个细胞,24h后加入受检物培养3天,洗涤细胞,在不含受检物的培养液中再培养4天,倒掉培养液,用姬姆萨法染色,计数细胞集落数目,并与阴性对照组比较,得到相对存活率,转化试验中所用的最高剂量组的相对存活率应大于50%,还应选择4个低剂量组(至少有2个无毒性剂量)。

4. 转化试验　用底面积为25cm^{2}的培养瓶,每瓶接种10^{4}个细胞,培养24h,然后按阴性对照、阳性对照和5个受检物剂量组分别处理,培养3天,洗涤细胞,继续培养4周,每周换2次培养液。细胞层用甲醇固定,姬姆萨染色,显微镜观察、计数转化细胞灶数目。

5. 转化细胞灶的计数　正常细胞为圆形的、染色一致的单细胞层。转化细胞灶的形态特征是:由紧密堆积的细胞所组成,周围呈不规则的方向杂乱的成纤维细胞,或者中心部位有坏死,或者中心无坏死但呈杂乱状态的细胞重叠。

有些转化细胞灶不要计数:①大转化灶附近出现的小转化灶(因它们是由大转化灶散逸出来的);②无方向不规则者。

为了确证选出的是否为转化细胞,可将其注射至裸鼠皮下,看是否产生肿瘤。

(三) 结果评价

1. 阴性对照数据除了本试验获取者外,还应结合以往的资料来分析,至少应有100~150个阴性对照皿的数据。

2. 某一剂量水平受检物的结果与阴性对照组比较,必须达到95%置信度上具有显著的统计学差异才认为该受检物具有转化活性。

3. 本试验中出现的转化细胞灶数目一般不随剂量增加而成比例增加。剂量如达到毒性剂量,转化灶数目可能减少。

(四) 注意事项

以下条件是进行结果评价的前提:

1. 阴性对照组应是连续单层细胞。若出现不连续单层细胞,提示培养条件不佳,这样的条件不能测出较弱的转化物质。

2. 阴性对照组每一个培养皿其转化细胞灶不应超过2个,否则需分离自发转化频率低的细胞原种(BALB/3T3亚克隆)。

3. 阳性对照组每皿平均转化细胞灶数,在99%置信度上与阴性对照组有显著差异。

4. 每个试验组至少有8个培养瓶的分析才有效。受检物至少须有4个剂量。

对转化细胞及其恶性程度的进一步鉴定可采用凝集试验、电镜观察、软琼脂培养和裸鼠接种等方法。这里简要介绍凝集试验和软琼脂培养的实验方法。

1. 刀豆球蛋白(ConA)凝集试验

(1)原理:细胞膜表面存在ConA的受体,当ConA与受体相互作用时,细胞间可发生凝集现象,凝集程度和快慢与ConA加入的浓度及细胞膜表面受体数目相关。转化细胞和癌细胞膜表面ConA受体数目明显增加,因此当在一定的ConA浓度下,转化细胞之间比之相应正常细胞之间其凝集反应快,凝集度大。

(2)操作步骤:用含0.02%蛋白酶E的PBS溶液将细胞消化下来,离心收集,用PBS制成细胞悬液(浓度为4×10′个细胞/ml),取1滴细胞悬液和1滴ConA,使ConA的浓度分别为100μg/ml、50μg/ml、25μg/ml、……0μg/ml。显微镜下观察凝集现象,记录开始凝集时间和凝集程度最大时的时间,并照相存档。

2. 软琼脂培养

(1)原理:正常细胞具有贴壁依赖性,而转化细胞失去了这一特性。由于这一差异,使前者不能在软琼脂中生长,后者则能,并形成细胞集落。所以软琼脂培养可以作为验证转化细胞的重要方法。

(2)操作步骤

1)琼脂的制备:用二蒸水分别制备1.2%和0.7%的琼脂液,高压灭菌后置于40℃备用。

2)无菌制备2×DMEM(含20%小牛血清),保存于37℃。

3)琼脂底层的制备:按1∶1比例将1.2%琼脂和2×DMEM混匀,取3ml注入直径6cm的平皿中(10cm的平皿加7～10ml),自然冷却凝固,置CO_2培养箱中备用。

4)制备细胞悬液,计数。

5)制备琼脂顶层:按1∶1比例将0.7%琼脂和2×DMEM在无菌试管中混匀,加入0.2ml细胞悬液,充分混匀后加在底层琼脂之上,待上层琼脂凝固后,置37℃的CO_2培养箱中培养10～11天。

6)在倒置显微镜下观察上层软琼脂中是否有细胞集落的形成,并计数集落数。

二、哺乳动物短期致癌试验

哺乳动物短期致癌试验又称有限动物试验,是在有限的短时间内接触化学物后,某个特定靶器官或组织发生肿瘤的情况。由于肺和肝是最常见的肿瘤发生器官,也是许多致癌物的靶器官,因此作为新化学物质致癌性筛检,小鼠肺肿瘤和大鼠肝转变灶两个试验的应用价值较高。至于小鼠皮肤肿瘤与SD大鼠乳腺癌两种试验,仅适用于部分类型的化学物质。

1. 小鼠肺肿瘤诱发试验　本试验系使用对肺肿瘤敏感的品系小鼠,于一次或多次化学物染毒后,或给予化学物1～2周后多次给予促癌剂(如丁基羟甲苯),在16～30周左右结束试验。如受试化学物具有诱发肿瘤作用,则在大体解剖或组织病理学检查中均可见到肺肿瘤。

2. 大鼠肝转变灶诱发试验　本实验根据实验性肝癌的发生过程有明显阶段性且癌前病灶能用组织化学技术检测的特点,对肝癌发生过程中几种明显可见的肝细胞病灶和

瘤性结节进行识别。如用已知致癌物进行染毒，一般在3周内可检测病灶，12～16周病灶增多。最早期的肝转变灶可小至仅由几个细胞组成，因此在常规组织病理学检查中容易漏检。采用酶组织化学和免疫组织化学染色技术则可在早期发现转变灶和瘤性结节中许多酶的改变，用以鉴别具有肝癌细胞生化表型的癌前细胞。如正常肝细胞的γ谷氨酰转肽酶和胚胎型谷胱甘肽转移酶染色阴性，但在胚胎肝细胞和肝癌细胞中为阳性染色。

上述任何一种试验出现阳性结果时，其意义与长期动物致癌试验相似。由于实验期短，仅观察某个器官，特别是皮肤肿瘤和乳腺癌的诱发试验适用的化学物种类较少，所以当哺乳动物短期致癌试验出现阴性结果时，不能排除假阴性。此外短期致癌试验反映的多是癌发生过程早期的病变，有些在其后的发展过程中可发生退变，对化合物致癌性的评价可产生影响。

三、哺乳动物长期致癌试验

大量动物试验结果表明，对人类有致癌作用的化学物质大多数都可在动物中得到复制。所以，通过动物试验可以对某种化学物是否具有致癌作用进行评价。本试验又称哺乳动物终生试验，是目前公认的确证动物致癌物的经典方法。

1. 受试化学物的有关资料　在长期致癌试验开始之前，研究者应当搜集受试物质现有的各种资料。包括：受试物的商品名和其他名称，化学结构式、分子式和分子量，物理、化学性质，人类每日可能接触的水平以及相关的生物化学资料，如吸收、分布、排泄、蓄积以及毒代动力学的资料。

2. 实验动物　一般常用两种啮齿动物，大鼠和小鼠。不同品系易感性有时可有明显差别，美国NCI推荐Fisher344大鼠和B6C3F1小鼠。动物年龄一般选用刚断乳动物，雌雄各半。

3. 剂量与分组　一般设计3个剂量组。高剂量最好采用最大耐受量，即不会致死、也不引起可能缩短寿命的毒性表现和病理改变或与对照组相比体重下降不大于10%的剂量。低剂量最好高于人类实际可能接触的剂量。必须设立阴性对照组。在用啮齿类动物作致癌性实验时，每组雌、雄动物各50只，对照组也应两种性别各50只。

4. 染毒途径　染毒途径尽量选择类似或接近于人类接触受试物的方式，主要有经口摄入、经皮吸收和经呼吸道吸入。其他途径的选用应有适当理由。

5. 染毒时间和实验周期　为了使实验动物接触可疑致癌物的期限足够长，通常这种实验从动物断乳后不久开始。一般不使用新生动物，因为幼年和成年动物在代谢能力、生理解剖特征、病毒易感性、激素水平、免疫能力等方面有差别。也有用多代致癌实验和怀孕动物胚胎致癌研究的报告，但是，这种做法的利弊尚需作进一步的探讨。

实验期限大鼠为104周，小鼠和地鼠为96周。在整个实验期，动物一直给药更好些，某些研究者喜欢在实验结束前数周停止给药进行观察，通常观察期为半年，就是说大鼠给药一年半，小鼠给药一年后停止给药，然后再观察半年。

如果对照组或低剂量组动物死亡率达75%，各组存活动物可处死，并终止全部实验。不管动物死亡率如何，大鼠实验不能持续130周以上，小鼠不能持续120周以上，地鼠不能持续100周以上。如果对照组或低剂量组大鼠在不足104周，小鼠不足96周，地鼠不足80周时动物死亡率超过50%，这种长期致癌性实验是不能令人满意的。

6. 观察内容与检查项目

(1)体重变化:在动物处于实验阶段的最初3个月,每周称一次体重,以后每2周称一次。每天观察食物消耗情况,最好记录每周食物消耗量。

(2)检查动物:每天上午、下午各检查一次动物,以便及时了解动物死亡与患病情况。为防止动物间相互残杀或咬伤,以及为了隔离,应将患病动物单笼喂养。如果需要的话,可用药物治疗,但任何治疗必须做记录,应避免使用长效药物,防止对受试物可能产生干扰。应仔细检查和记录异常组织肿块的产生、肿块部位、大小及其生长情况,也应注意毒性体征。

如果数只动物在一个笼中喂养,发现动物死亡,应及时解剖,否则易被其他动物吃掉,造成标本损失。

(3)实验室检查:致癌实验的主要目的是确定化学物的致癌性,不像在毒性研究中各种毒性作用都要观察,因此,除了常规的血液学检查,不作其他方面的检查。如与慢性毒性试验结合进行,可参照慢性毒性试验的要求。

(4)尸检:死亡或濒死动物都进行解剖。实验终止时将存活动物全部处死进行剖检。剖检时应称量某些实质性脏器的重量,如肺、肝、肾、心、脾、睾丸、脑等。

保留标本作组织检查,发现组织和器官异常时作显微镜检查,通常应检查下列组织:颌下淋巴结、唾液腺、乳腺、胸骨、股骨、脊椎骨、胸腺、甲状腺、甲状旁腺、气管、大支气管、肺、心、食管、胃、小肠、结肠、肝、胆囊、胰腺、脾、肾上腺、肾、膀胱、前列腺、睾丸、子宫、卵巢、脑垂体、眼球(大体检查是否发现异常)和脊髓(有无神经体征)等。

(5)结果分析和评价:发现第一例肿瘤时存活的动物数确定为有效动物数,各种分析指标都以该动物数作为基数计算。主要评价指标为:

1)肿瘤发生率:是本实验最重要的指标,指实验结束时患瘤的动物占有效动物数的百分比,用%表示。要求计算肿瘤总发生率、恶性肿瘤总发生率、各器官或组织肿瘤发生率和恶性肿瘤发生率,以及各种类型肿瘤发生率。

2)多发性:是化学物质致癌的特征之一,系指一个动物出现多个肿瘤或一个器官出现多个肿瘤。一般计算每一组的平均肿瘤数。

3)潜伏期:指从动物接触致癌物开始,到出现第一个肿瘤的天数。致癌物剂量愈大潜伏期愈短。可以用各组第一个肿瘤出现的时间作为该组的潜伏期。这种办法只适用于能在体表观察的肿瘤,如皮肤肿瘤或乳腺肿瘤。内脏肿瘤则需分批剖杀计算平均潜伏期。

对阳性结果的评定应当慎重。分析指标时应注意有无剂量反应关系,并与对照组之间进行显著性检验。当出现剂量反应关系,并与对照组存在显著性差异时判为阳性结果。当染毒组出现对照组没有的肿瘤类型时也应判为阳性,但应有历史对照资料。

(庄志雄)

第三节 发育毒性和致畸作用试验

评价化学物的发育毒性的试验包括动物试验和体内外筛检试验。最佳方案是对成年动物进行染毒并试验,包括子代从受精卵到性成熟的所有生长发育阶段;观察期贯穿一个

完整的生命周期，以检测近、远期效应。选择各种方案的关键在于试验对生殖和生长发育各阶段的影响无间隔，并可直接或间接评价生殖循环的全过程。用一个试验研究全部发育毒性的终点是不可能的，最常选用的方案是三段生殖毒性试验。

一、三段生殖毒性试验

三段生殖毒性试验共同的要求：

1. 动物选择　大鼠是啮齿类首选动物，最常使用的非啮齿类动物是兔。

应选择年轻、性成熟的雄鼠与未交配过的雌鼠。雄大鼠的最适交配日龄为 90 日，雌大鼠为 80 日；小鼠的最适交配日龄为 65～80 日。家兔性成熟较早，小型品种 3～4 月龄，中型品种 4～5 月龄，大型品种 5～6 月龄，它们的最适交配日龄比性成熟约推迟 1 个月。

2. 动物数　应保证足以有统计学意义地解释资料。要除外畸胎、流产、全胎死亡等异常情况，啮齿类动物和非啮齿类动物各选用 16～20 窝，即可保证试验的一致性。

3. 时间　交配时间必须准确查到精子或阴栓之日计为妊娠 d0。仔鼠出生之日定为 pd0。

4. 剂量选择　可采用药理学、急慢性毒性试验、毒物动力学等的基础资料确定最高剂量，连续 2～4 周的染毒可相当于生殖毒性的分阶段试验。如果资料不足，应进行预试验，高剂量组应是有轻微母体毒性的剂量，但孕鼠死亡率不得高于 10%。母体毒性表现为：体重增长减缓或体重增长加快，特别是当激素分泌受干扰时；特定的靶器官毒性；血清学、临床生化学的异常；或过度的药理反应（如：镇静、惊厥）。药物的最大限量一般应为 1g（kg・d）。动力学资料可用于确定低毒性化合物的最高剂量，但是，如果增高剂量并不增高血液或脏器内的药物浓度，则没有必要增高剂量。高剂量确定后，依次确定较低剂量。剂量的间隔应根据动力学和其他毒性资料，设计应能测定 NOAEL。

5. 给药途径　要求与人类预期接触和使用的途径相同，若有动力学资料表明其他途径的合理性，如表现出相似的体内分布，也可作为次选途径。

（一）对生殖能力及从早期胚胎发育到着床的影响的研究

1. 目的　检测从雌雄动物交配前、交配期、直到着床期间进行染毒产生的毒性效应或干扰。

雌性动物可检测对雌激素周期、输卵管运输、着床、着床前孕体的发育的影响；雄性动物可以检测对生殖功能的影响（如性欲、附睾中精子的成熟），而这些功能改变无法通过雄性生殖器官的组织学检查进行检测。

2. 试剂与器材　感量 0.01g 的电子秤（称量体重用），感量 0.001g 的电子秤（称量脏器用），生物显微镜，解剖剪、镊子和解剖板若干套，眼科剪、眼科镊若干套，烧杯、量筒、吸管、玻棒、试管及试管架、滤纸适量，血细胞计数板，标本瓶等。10%甲醛固定液。

3. 操作步骤

（1）动物选择及数量：至少要一种动物，最好是大鼠。建议 16～20 窝。

（2）交配：交配比例最好为 1∶1，交配过程应保证可同时确认各窝的父、母代动物，交配期一般 2～3 周。

（3）持续给药期间：一般推荐交配前雄鼠给药 4 周，雌鼠 2 周。染毒应持续至雄性动物交配结束后处死，并且至少到雌性动物的整个着床期，从而可以评价对雄性的生殖能力

（不能由持续染毒后的组织学检查检测）和雌、雄交配行为的影响。

交配前染毒期间应当给出理由。ICH 认定，与雌鼠交配不是检测对精子发生的影响的敏感方法。精子存活率和形态学检查等可为生殖毒性研究观察到的毒作用提供更敏感的终点，而且已知影响精子发生的外源化学物几乎总是影响减数分裂的后阶段（精子成熟前 3～5 周）。对雄性性腺组织和器官进行仔细的组织病理学检查可对雄性生育力和精子发生的影响提供有价值的补充信息。所以将雄性染毒期缩短为 4 周，并结合组织病理学检测。

（4）解剖：雌性动物可在妊娠中期以后的任意时间点解剖（d15 以后）。雄性动物可在交配后任意时间解剖，但在已能肯定受孕成功后再解剖更合适。

4. 观察指标　试验进行中，每天记录有关症状及死亡；至少 2 次/周称重及记录体重变化；交配期每天记录阴道分泌物以确定其是否交配及受试物对性周期的影响；其他毒理试验研究中的观察指标

实验终末观察指标　所有成年动物称重后处死、尸解；对肉眼查见异常的器官进行组织学检查，并保留对照组相应的器官；保留所有动物的生殖系统（睾丸、附睾、子宫、卵巢）供组织学检查；睾丸及附睾称重并计算脏器系数；附睾精子计数和精子活动能力分析；黄体数、着床位置（着床腺）计数；活胎、死胎（吸收胎、晚死胎）计数。对表面看来未孕的大、小鼠，用 10%硫化铵进行子宫染色 15～20min 以确定是否有受精卵着床（痕迹）。

5. 结果分析与评价　对各项指标的统计分析，对胎儿应以“窝”为单位；对亲代的资料，以个体或交配对为单位。应考虑受影响的窝的比例；每窝受影响的胎仔的组均百分率；受影响的胎仔总数比例。评价配子成熟，交配行为，受精，孕体着床前的发育，着床。

（二）对胚胎-胎儿发育影响的研究（传统致畸敏感期试验）

1. 目的　检测出从着床到硬腭闭合期间内对雌性动物持续染毒下，对受孕动物和胚胎、胎儿发育的有害影响。包括致死作用、生长迟缓和结构异常。

2. 试剂与器材

（1）器材　解剖剪、镊子，眼科剪、眼科镊，解剖板，胎鼠固定板、刀片，滤纸，标本瓶、平皿、生物显微镜、体视显微镜、电子天平和游标卡尺。

（2）试剂．①1% KOH、2% KOH 溶液；②70% 乙醇溶液；③茜素红原液：取冰醋酸 5ml，纯甘油 10ml，1%水合氯醛 60ml，混合后加茜素红粉状指示剂至饱和备用；茜素红应用液：使用前用 1% KOH 将茜素红原液稀释 100 倍；④透明液Ⅰ：甘油 200ml、2%KOH 溶液 30ml 加蒸馏水至 1000ml；透明液Ⅱ：甘油 500ml、2% KOH 溶液 30ml 加蒸馏水至 1000ml；⑤Bouin 液：用饱和苦味酸（2，4，6-三硝基酚）水溶液 750ml、40%甲醛 200ml、冰醋酸 50ml 配制成 Bouin 液 1000ml；⑥阿利新蓝染液：取 15mg 阿利新蓝染料，加 95%乙醇 80ml，再加 20ml 冰醋酸。

3. 操作步骤

（1）动物选择：多选用两种动物，一种为啮齿类，常用大鼠；要求选择第二种哺乳动物。多选兔作为非啮齿动物，因已有大量相关资料积累并具备可行性、实践性。但是，兔常缺少动力学和毒理学资料，对某些抗生素和营养干扰措施易感，临床症状难以解释，即兔不作为抗生素的首选试验动物。在条件不适宜的情况下，也可选择另一非啮齿动物或第二种啮齿动物。应给出选用动物种类的理由。

(2)动物数量：一般每个剂量组16～20窝。

(3)剂量设计和分组：剂量大小是试验成败的关键之一，剂量太大，产生的胚胎毒作用大，结果引起较多的死胎、吸收胎，甚至引起母鼠中毒死亡；剂量太小，低于致畸作用的阈剂量，则又不引起畸形。一般设3个试验组，最高剂量组应是有轻微母体毒性的剂量，最低剂量组不应引起明显的毒性效应，中间剂量要有助于观察评价剂量反应关系。可依据：①亚急性毒性试验的最大耐受量作为致畸试验的最高剂量，以其1/30为最低剂量。②以LD_{50}为参考，以LD_{50}的1/3～1/2为最高剂量，LD_{50}的1/50～1/30为最低剂量。③人体实际接触量。另设2个对照组，一个为空白对照或溶剂对照，用以提供自发畸形率等资料(由于自发畸形发生率很低，在一次试验中有可能为0。强调应以实验室积累的历史对照值，或文献报道的自然发生率为准，作为与实验组对比的显著性测定)；另一个为阳性对照，用于检测试验系统的正确性。常选用的阳性药物有敌枯双(0.5～1.0mg/kg.bw)、阿司匹林(250～300mg/kg・bw)、维生素A(7500～13000mg/kg.bw)、五氯酚钠(30mg/kg.bw)等。

(4)交配：动物交配期室温应保持在20℃～25℃，环境安静。

合笼：通常大鼠按雌∶雄1∶1、小鼠按雌∶雄2∶1的比例，每晚18∶00～20∶00合笼，次日晨8∶00～8∶30取出雄鼠，以4～5天为1个周期进行交配(大鼠性周期4～5天，小鼠性周期为4天)。

受孕鼠的检出：通常做阴道涂片检查或检查阴栓。

雌鼠阴道涂片的检查：用一浸湿生理盐水的棉签，轻插入阴道，转动数周后取出涂片，用低倍镜观察。

雌鼠阴栓检查：阴栓是雌雄鼠交配后雄鼠的精液和凝固腺分泌物与雌鼠阴道分泌物的混合物，呈圆锥形，白色。大鼠阴栓一般在交配后2～8h内自行脱落，故通常检查笼底有无脱落的阴栓(当1∶1交配时，查见阴栓即可)，并以阴道涂片查见精子为准。小鼠交配后形成的阴栓一般仍留在阴道内，有时位置较深，需用镊子撑开阴道口方能看见阴栓；有时粘附在阴道口上。

查见精子或阴栓之日记为妊娠d0，随机将孕鼠分配到各实验组和对照组。

(5)给药时期：应在器官形成期给药，大鼠孕后6～15天，小鼠为6～15天，兔为6～18天。

(6)给药途径：给药途径原则上是依据人类可能接触的方式等情况，及受检物的性质而定，经呼吸道、经口、经皮、腹腔注射或尾静脉注射等。

(7)处死：在自然分娩前一天称重并处死孕鼠，剖腹检查亲代受孕情况，并检查所有胎仔的存活、发育和畸形。大鼠为d20，小鼠d19，以防止自然分娩后，母鼠吞噬畸形仔。

4. 观察指标

(1)试验中对亲代动物：至少每天一次观察中毒征象和死亡，雌鼠增重情况。一般3d称重一次，一为调整受试物量，二来观察是否受孕，以便及时补上，保证有足量的孕鼠。至少每周一次测量并计算食物摄入量和已在其他毒理学实验中证实有意义的观察指标。在染毒期间应注意，实验期间死亡或濒死的动物应进行尸体解剖以确定其死因或濒死的原因，靶组织应保存在10%的甲醛溶液中做组织病理学检查，对有流产或早产迹象的动物亦应处死作大体检查。

(2)试验终末指标：动物处死后，立即从腹中线剖腹；称量带胎仔的子宫重，计算 d20 孕鼠重减去带胎仔的子宫重，再减去 d6 体重后得到孕期增重；分离出卵巢，在解剖镜下计数黄体数以确定排卵数；仔细观察着床数（如宫内无着床位点应用硫化铵染色加以确认）——黄体数减着床数计算着床前丢失；吸收胎数，晚死胎数，活胎数。称量每个胎儿的体重；区别性别（通过测量肛门和生殖结节的距离区别）、测量顶臀长度、尾长。然后从头到尾依次仔细检查有无外观畸形：①头部畸形：观察有无脑积水、露脑（无颅盖骨）、无脑畸形、脑膜膨出、无眼、小眼、无耳、小耳、腭裂等；②四肢畸形：观察有无多趾、并趾、少趾、无趾、足内翻、短肢等；③躯干畸形：如脐疝、腹裂（内脏膨出）、脊髓膨出（呈水泡突出）、脊柱裂、脊柱侧突等；④尾畸形：观察有无短尾、卷尾、无尾、尾分叉等；⑤有无肛门闭锁等。胎盘称重并进行总体评估。将胎儿单个进行标记，以进一步评价不同方法观察所得结果之间的关系。

(3)骨骼检查：骨骼标本的染色有单染法和双染法。

单染法：胎鼠用 80%乙醇固定 2 天；取出胎仔用流水冲洗后，移入 1% KOH 溶液中透明 2～7 天，每隔 1～2 天更换 1% KOH 溶液一次；将胎仔移入茜素红应用液中 2～3 天，至骨骼完全被染成桃红色。此过程中如果发现染色液褪色应及时更换；将胎仔移入透明液Ⅰ、Ⅱ中各 1～2 天，如果透明度不佳，可适当延长在透明液中的时间。标本已经可供检查，如果要长期保存，可将其保存在 100%的甘油中，另加几滴氯仿或麝香草酚结晶防腐。

双染法：首先将胎鼠浸于 70 ℃的水浴中约 7s，剥去皮，接着将胎鼠浸入 95%乙醇中固定过夜，第二天改用阿利新蓝（Alician blue）染液染色。24h 后再换用 95%乙醇，24h 后倾去乙醇，将胎鼠浸入茜素红应用液 24～48h，倒去染液，用 1%KOH 溶液处理 24h，将胎仔移入透明液Ⅰ、Ⅱ中各 1～2 天，如果透明度不佳，可适当延长在透明液中的时间。标本已经可供检查。已骨化的骨骼将染成红色或紫红色，软骨染成蓝色。

常见的骨骼畸形和骨化迟缓有：①头部骨骼：颅顶骨缺损、骨化迟缓（表现为囟门过大），枕骨缺损、缺失（枕骨骨化程度分级：0 级：上枕骨呈片状或哑铃状，两侧骨化点完全融合，融合处宽度大于两侧的 1/3；Ⅰ级：上枕骨两侧骨化点相连，相连处宽度小于两侧的 1/3；Ⅱ级：上枕骨两侧骨化点不相连，但可清楚地见到两个较大的骨化点；Ⅲ级：上枕骨两侧骨化点不相连，仅见小骨化点；Ⅳ级：无上枕骨骨化点）；②椎骨：颈椎骨缺损、椎弓不连续、骨化迟缓，腰椎缺失、分裂变形，盘骨缺失，尾椎骨缺失、椎弓不连续、融合；③胸骨：正常情况下胸骨是 6 个，骨化迟缓或骨骼畸形时可发生胸骨节缺损或消失，单、双骨化点或不到正常的 1/2，胸骨节错位等，其中以第 2、5 胸骨节最易发生缺失或骨化不全；④肋骨：正常大小鼠肋骨为 13 对，可出现多肋、少肋、肋骨分叉、肋融合、波状肋等；⑤四肢骨：观察骨化程度、粗短、畸形、多趾（指）、少趾（指）等。

(4)内脏检查：取每窝的 1/2 活胎，放入 Bouin 液固定 2 周。二周后取出胎鼠，自来水冲去 Bouin 液，用刀片进行切片检查。切片和检查方法可采用下述任何一种。①胎鼠头部四刀法切片：沿口经耳作水平切面，检查有无腭裂、舌异常；沿顶部作三个纵切面：口角额状切面，观察鼻道是否扩大，是否是单鼻道，鼻中隔是否正常等；（备用切面：眼球前沿切面）两眼球正中额状切面，检查眼球大小；眼球后头顶垂直额状切面，检查有无脑水肿等；然后沿腹中线和肋下缘水平线各切一刀，暴露胸腔与腹腔脏器，检查各脏器大小、位置、有

无心脏室间隔或瓣膜的缺损、隔疝等，再取出肝脏与肾脏，观察有无异常、缺失、肾积水等，并检查子宫（有无输卵管积液）或睾丸；②将胎鼠放在蜡板或木板上，剪去四肢和尾，左手固定胎鼠，右手持刀片从头部逐一往下作横切片，共切11～12片，其操作步骤见表3-3。

表3-3 胎鼠徒手切片检查内脏畸形

切片顺序	下刀部位和方向	横断面所见
1	从鼻孔下通过眼球中部向上部切	大脑、侧脑室、眼球、鼻中隔、鼻腔
2	把嘴打开，从舌向口角下切，向枕部切	大脑、间脑、延脑、下横断面看腭裂
3	齐下颌向颈后切	舌、鼻咽腔、延髓
4	从双肩上沿向颈后切	气管、食道、胸腺
5	从前肢剪断面中央向后切	肺、纵隔、心房、脊髓
6	从剑突下向后切	肺、心室、心室中隔
7	脐至剑突间1/2处向后切	肺、横膈
8	从脐向后切	肝、胃（小部分）
9	腹股沟至脐间1/2处向后切	胃（大部分）、肝、十二指肠、肾上腺
10	相当于髂骨前棘处向后切	胃（小部分）、肝、肾、脾、胰、肠
11	不必切，用眼科镊解剖	生殖器、膀胱、肾

5. 结果分析和评价

（1）结果分析：按不同剂量组计算：①母体的观察终点：孕鼠平均增重，食物消耗量，母体畸胎率（出现畸胎的母体总数/妊娠孕母总数×100%）；②孕体观察终点（以窝为单位）：着床位点数/母鼠；活胎数和百分率/窝；吸收胎数和百分率/窝；有吸收胎的窝数和百分率；晚死胎数和百分率/窝；非存活（晚死胎+吸收胎）的着床数和百分率/窝；出现非存活着床的窝数和百分率；存活胎仔的窝数和百分率；活仔数和百分率/窝；受影响（非存活+畸形）的着床数和百分率/窝；有受影响着床数的窝数和百分率；性比值/窝；平均胎仔体重/窝；平均胎仔体重/窝；有外观畸形的胎仔数和百分率/窝；内脏畸形的胎仔数和百分率/窝；骨骼畸形的胎仔数和百分率/窝；畸形的胎仔数和百分率/窝；有畸形胎仔的窝数和百分率；畸形雄仔数和百分率/窝；畸形雌仔数和百分率/窝；有变异的胎仔数和百分率/窝；具有变异的窝数和百分率；各种畸形的类型和发生率；各种变异的类型和发生率；分别列出有各种畸形和变异胎仔（根据窝和剂量分组）；临床症状；大体解剖和组织病理学。

（2）结果评定：根据观察到的效应和产生效应的剂量水平进行评价，主要有以下两种方法。

致畸指数（TI）以最小致畸剂量求得致畸指数，表示致畸强度。

致畸指数＝雌性动物LD_{50}/最小致畸剂量

评判参考以下标准：致畸指数小于10为基本无致畸危害；致畸指数大于10为有致畸危害；致畸指数大于100为强致畸危害。

相对致畸指数（RTI）：致畸指数考虑了母体毒性的问题，但LD_{50}并非很好的指标。因为不同的化学物的急性致死剂量反应关系曲线坡度不一。因此，有人采用相对致畸指

数(RTI):即成年动物LD₁、最小致死剂量)与诱发5%畸形发生率的剂量之比,比值越大,表示致畸度愈大。

(三)对围生期的发育及母体功能的影响研究

1. 目的　观察从着床到断奶期间染毒对母代妊娠、分娩、哺乳的影响,和对孕体和幼仔发育的影响。

2 操作步骤

(1)动物选择及数量　至少使用一种动物,最好是大鼠。建议16～20窝。

(2)持续给药期间　大鼠从妊娠d6到分娩后d20。

3. 试验进程　雌性动物分娩并哺育其子代直到断乳,断乳时每窝随机选出雌雄各一只继续喂养到成年起并进行交配以评价生殖能力。关于是否进行窝内的淘汰以调整窝的大小,目前还有争论,应由研究人员自己加以解释决定。有人认为在试验中,每窝中应随机保留相同数的雌雄幼仔,以排除窝大小的影响。

4. 观察指标　观察并记录:

(1)试验中的母代动物:至少每天一次观察中毒症状和死亡,至少每周两次称量体重,分娩前至少每周一次食物称量并计算食物摄入量、其他毒理实验中已证实有价值的观察指标、妊娠期长短,分娩。

(2)终点观察指标:尸解成熟动物;对肉眼查见异常的器官进行组织学检查,并保留对照组相应的器官;着床数、畸形,出生存活率、出生死亡率,出生体重,断奶前后的体重和存活率,生理发育(如:立耳、开眼、上下齿萌出、长毛、阴道开口、阴囊下降或包皮腺分裂等),感觉功能及反射(如:平面翻正、悬崖回避、平面旋转、听力警觉、视力定向、嗅觉定向以及前肢握力等)和行为检测(参见第七章,第三节 行为致畸毒性测试方法)。

5. 结果分析与评价　与未孕雌性动物相比是否毒性效应更强,出生前后子代的死亡,生长发育的改变,子代(F1)功能缺陷,包括行为、成熟(青春期)和生殖功能。

二、大鼠体外全胚胎培养试验

上个世纪70年代,英国剑桥大学的生理学家New提出了着床后大鼠全胚胎培养试验(whole embryo culture,WEC)静式培养法。WEC为体外动态观察胚胎的正常生长发育和探索研究外源性化合物的致畸性、发育毒性等提供了一种有效的、特殊的研究手段。1997年到2000年,欧洲替代方法确认中心(ECVAM)对WEC、小鼠胚胎肢芽细胞微团(MM)试验、胚胎干细胞试验(EST)进行了成功的确认研究。这三个试验现已被欧洲医药工业和化学工业的安全性评价实验室常规使用。

各国科学家公认9.5d龄大鼠胚胎和8.5d龄小鼠胚胎是最适于体外培养的实验对象,并把New建立的方法定为WEC的基本试验。尽管在胚胎移植、镜下显微解剖、混合供气和培养过程中的某些细节上有所差异,但在总体实验流程上各实验室间基本相同。

1. 目的　在体外动态观察胚胎的正常生长发育和探索研究外源性化合物的致畸性、发育毒性及其机制。筛检致畸源,探讨剂量-反应和时间-效应关系。

2. 原理　9.5d龄大鼠胚胎在体外培养48h后,其生长发育和形态分化与体内同龄胚胎生长发育和形态分化之间差异无显著性,为体外动态观察胚胎的正常生长发育和探索研究外源性化合物的致畸性、发育毒性等提供了一种有效的和特殊的研究手段。

3. 仪器、试剂和材料

(1)仪器、试剂 离心机;解剖显微镜;4 ℃冰箱, -20 ℃冰箱和低温冰箱;电子天平;微孔滤器(0.22 μm);恒温水浴箱;干燥箱;高压蒸气消毒锅;超净工作台;钟表镊子(加工磨尖的和未加工的);乙醇灯;解剖剪;止血钳;眼科剪、眼科镊和眼科弯镊;普通镊子、普通剪子和长柄镊子;钉子;各种不同规格的离心管、吸管、烧杯、广口瓶、量筒、磨口试剂瓶和青霉素瓶;大饭盒;10～20ml 注射器;12～16 号针头和腰穿用的长针头;玻棒;塞子;脱脂棉;70%乙醇;青霉素和链霉素;乙醚等麻醉剂。不同规格的平皿。

带旋转装置的培养箱、混合供气系统、培养瓶 管(30～50ml)、三蒸水等。

(2)平衡盐溶液:可采用 Hanks 液或 Tyrode 液。Hanks 液配方(g L)为:NaCl,8.0;KCl,0.4;$MgSO_4 \cdot 7H_2O$,0.2;$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$,0.06;$KH_2PO_4 \cdot 2H_2O$,0.06;$CaCl_2$,0.14;葡萄糖,2.0;$NaHCO_3$,0.35。首先将 $CaCl_2$ 溶解于 1.0ml 双蒸水中配成甲液。次递将其他各成分逐个溶解于 800ml 双蒸水中,溶解时必须等前一种试剂完全溶解之后,再加入下一种试剂,直到所有试剂溶解后摇匀,为乙液。缓慢将甲液加入乙液中,不停地搅动以避免形成沉淀。补加双蒸水至 1000ml 混匀即为 Hanks 液。分装,常规高压蒸气消毒,4 ℃冰箱贮存备用。使用前,用 $NaHCO_3$ 溶液调 pH 值至 7.2～7.4。用于 WEC 的 Hanks 液不加酚红,以避免桃红色的 Hanks 液造成视野不清晰,不利于胚胎外膜的剥离和胚胎移植。

(3)培养基:大鼠立刻离心血清(immediately centrifuged serum, ICS)制备采用与 WEC 同种的健康成年大鼠,用乙醚吸入麻醉 5min 左右。当大鼠倒下,角膜反射迟钝,四肢紧张性明显降低,胸式呼吸减慢但平稳,对痛觉刺激无感觉时,表示大鼠已进入麻醉状态。也可用巴比妥钠、戊巴比妥钠等腹腔注射麻醉。将已麻醉的大鼠仰卧位固定,用 70%乙醇消毒腹部皮肤 2～3 次,解剖剪自下而上剪开腹壁做"V"形切口,翻至前胸并用止血钳固定。用钝头镊子拨开腹腔各脏器,小心分离和暴露腹主动脉,右手持 10～20ml 注射器(12～16 号针头),45°角刺入腹主动脉,沿动脉壁向心方向进针约 1cm,快速抽血直到大鼠呼吸停止(每只大鼠可抽血 7～13ml)。去掉针头,贴壁轻柔将血移入离心管中,迅速平衡,在血液凝固前立即离心(3000～3500 r min)至少 5min。用大镊子轻轻挤压离心后的上层纤维血清凝固体,使其释出血清,然后再离心(3000 r min)15min。用注射器抽吸表层琥珀色血清,用针头滤器过滤,滤速以 1 滴 1 滴流下最佳。获得的血清即为 ICS。加入青霉素和链霉素(终浓度均为 100 IU ml ICS)。分装至无菌青霉素小瓶或 10ml 离心管中,标注日期,-20℃或低温冰箱中保存备用。如果在 24h 内使用,可放在 4℃冰箱保存。用前 56 ℃水浴灭活补体 30～40min,灭活时,将盖打开,使麻醉剂挥发。冷却至室温后,即可用于 WES。

ICS 作为 WEC 的最佳培养基,由于需处死大量动物,制备麻烦,费用亦相对较高,故成为其常规应用的制约因素之一。近年来,为了使培养基的使用方便化和商品化,许多学者对 ICS 和培养基的问题进行了大量的探索,但至今仍未找到一种理想的 ICS 替代品。

WEC 常用的培养基(表 3-4):

4. 胚胎的获得

(1)孕鼠的获得:WEC 选用健康大鼠。一般情况下,动物房昼 夜时间比例为 10 14 或 12 12h。假设夜相中点为交配高峰时点,12h 后的那一时点定为第 0.5d。雌鼠体重

200～250g；雄鼠>250g。夜相起始点合笼（雄∶雌为1∶1～3），次日晨检查交配情况。1∶1合笼时直接检查托盘中的阴栓；1∶2～3合笼需进行雌鼠阴道分泌物涂片检查精子。

表3-4 WEC常用的培养基

培养基	百分比(%)	作者
ICS	100	New(1978年)
ICS+MEM	75+25	Freeman(1987年)
ICS+人血清	10+90	Lear(1983年)；Ret.(1982年)
ICS+[illegible]蒸水	90+10	Klein(1980年)
ICA+人血清+Weymouth培养基	[illegible]	Mirkes(1981年)；Freeman(1987年)
ICS+HBSS	33+67	Harris(1995年)
ICS+胎牛血清+Weymouth培养基	35+15+50	Henry(1993年)
ICS+HBSS	50+50	Tuckett(198[illegible]年)
ICS+DMEM	50+50	Sadler(1985年)

查得阴栓或精子日定为妊娠d0。

(2)胚胎移植：解剖孕9.5d龄大鼠移植发育中的活胚胎，应在室温下进行，如在<10℃的室温下操作几小时，将会对培养胚胎发育产生不良影响。

颈椎脱位法处死大鼠，仰卧位固定，用70%乙醇冲洗消毒腹部。从后腿根部起剪一大的"V"形切口，其前端靠近胸部，用普通镊子和剪子打开腹壁并向上翻至前胸，用止血钳固定。改用无菌剪子、镊子，从子宫颈处剪断并从剪断部位轻轻提起"V"形子宫，在子宫与卵巢连接处剪断，移入无菌大平皿中。用无菌Hanks液冲洗子宫，剔除脂肪和肠系膜，移入另一平皿，加入足够的Hanks液清洗子宫。从卵巢端用眼科镊提起子宫，剪一小口，从小口处轻轻插入眼科剪，紧贴子宫壁，向宫颈轻柔划开。注意千万不要损伤内部的蜕膜组织。当子宫壁完全被打开后，修剪和拉平子宫壁。然后用眼科镊压在膨起的蜕膜团之间，再用眼科弯镊轻柔挤压蜕膜基底部并向上提，分离蜕膜团。重复分离全部蜕膜团，并移入另一平皿中，加入少量Hanks液。此时肉眼看，蜕膜团呈"梨"形，其大头是蜕膜基底部分。

随后除去"梨"形的蜕膜组织：右手先用一把钟表镊子刺入蜕膜基底部（大头），将其夹开，左手用另一把钟表镊子轻轻从夹开处夹住已分开的一侧蜕膜，右手镊子再夹住蜕膜的另一侧，轻轻撕开，将蜕膜分成两块，其中一块上带有9.5d龄的胚胎。对带有胚胎的那一半蜕膜组织重复操作，使其再一分为二。用钟表镊子的尖部刺入带有胚胎的蜕膜两端，轻轻撑开，再用另一把钟表镊子的尖背部将胚胎从蜕膜上推下来。依次分离同窝的所有胚胎。

将所有胚胎移入另一盛有Hanks液的培养皿中。在解剖显微镜下进行胚胎外膜分离[illegible]Reichert's分离术。镜下可见胚胎尖部有一小的透明区。用一把精心磨过的钟表镊子刺入这一区域并牢牢夹住，然后用另一把钟表镊子夹住对侧的部分Reichert's膜，轻轻撕开至外胎盘圆锥处。有的胚胎Reichert's膜在镜下不能被清楚地观察到，必须依靠操作者的经验小心地夹住它，在不损伤脏层卵黄囊的前提下，将Reichert's膜打开。

当同窝胚胎的 Reichert's 膜全部被打开后，镜下仔细观察，去除受损的、发育过小的胚胎。然后用灭菌吸管将胚胎移入含培养基的培养瓶中。

上述步骤应在 2 h 内完成。

5. 操作步骤

(1)染毒方式：根据研究的目的，可进行下列体内、外染毒方法：用显微注射法将化学物质直接注射到胚胎的特定部位；将化学物质加入培养基，加或不加体外代谢系统（如 S9 混合液）；对大鼠染毒后用其血清作培养基；孕鼠染毒后取其胚胎在正常的培养基中培养；加入物理性有害因素（如温度）或将有害气体充入培养瓶内的空气中。

(2)胚胎培养：在体外培养全胚胎的过程中，必须供应适量的氧气，氧气浓度必须随着胎龄的增加而增高，过量和过少的氧气均可造成胚胎生长发育迟缓、畸形和死亡。所有不同浓度的混合气体都必须含 5% CO_2，以维持 pH 平衡和氮平衡。目前国内外最常用的方法是间断充气旋转培养法：①在 30ml 或 50ml 的培养瓶/管内加入 3～5ml 培养液。②充入含 5%O_2：5%CO_2：90%N_2 的混合气体 30s，迅速在培养箱中旋转平衡 15～30min。③取出培养瓶/管，将已分离好的胚胎移入培养瓶/管中，每瓶/管 3～5 只。④立即向培养瓶/管中充入 5%O_2：5%CO_2：90%N_2 的混合气体 2～3ml，充气流量以气体轻微吹动液面为好，然后用塞子塞紧瓶/管口。⑤将培养瓶/管水平塞入旋转器上的相应孔中，然后开动旋转器。转速 35±5r/min。培养温度 37℃～37.5℃。⑥旋转培养 14～24h 后，以及再次旋转培养至第 24h 后，两次取出含胚胎的培养瓶/管，肉眼或用放大镜观察胚胎的生长发育状况后，分别进行第二次和第三次充气。混合气体的比例是：第二次 20%O_2：5%CO_2：75%N_2；第三次 40%O_2：5%CO_2：55%N_2。然后重复步骤①和步骤⑤。

继续旋转培养至第 48～72h（培养期为 72h 时，应在 48h 时补充血清 2～3ml/胚胎，并充入 40% 的 O_2；在第 54h 时充入 95% 的 O_2）。收获胚胎并进行各生物终点的观察。

5d 龄大鼠胚胎正处于头褶期，起始体节数是 0～3 节，培养 48～72h 后最终体节数为 26～29 节。

根据选用大、小鼠及其胚胎移植日龄的不同，培养方案有所不同。

6. 结果分析与评价　培养结束后，评价胚胎生长发育和器官形态分化的主要终点包括以下几个方面：

(1)反映胚胎生存情况的终点：在解剖显微镜下直接观察胚胎心跳和血液循环。如两者消失，表示胚胎死亡；反之，胚胎存活。

(2)反映胚胎生长发育的终点：在解剖显微镜下用目镜测微尺直接测量卵黄囊直径、颅臀长、头长、体节数；测量胚胎蛋白质、核酸含量或胚胎干重。

卵黄囊直径：将收获的胚胎移至盛有 Hanks 液的培养皿中，测量与外胎盘切线相平行的卵黄囊最大直径长度（单位 mm）。

颅臀长和头长：颅臀长指自然状态下的胚胎最大体长（单位 mm）；头长指前脑顶部至中脑背侧部之间的最长距离（单位 mm）。

体节数：与前肢芽中部相垂直的体节定为第 9 体节；与后肢芽中部相垂直的体节定为第 28 体节。

胚胎蛋白质、DNA 或 RNA 含量：因处于器官形成期时的胚胎体重不易测定，故目前国内外均以蛋白质、DNA 或 RNA 含量反映胚胎发育情况，国内有以胚胎干重作为评价

胚胎生长发育的主要监测指标的。

胚胎干重测定：生长发育和形态分化检测后的胚胎用90%～95%的乙醇固定；100%乙醇脱水、过夜；90 ℃烤箱中烘干40min左右。电子天平称重（单位mg）。

表3 5 Brown的大鼠胚胎发育评分法

组织器官	评分				
	0	1	2	3	4
卵黄囊血管	无或散在血岛	血岛吻合	较少卵黄囊血管	完整的卵黄囊血管从	卵黄囊消失，动静脉分离
尿囊	尿囊在胚外体腔中游离	尿囊与绒毛膜融合	脐血管	脐	卵黄囊动脉原基分离
体屈	腹凸	翻身转位	背凸	背凸和扭转	
心脏	无心跳	“S”形心血管，有心跳	旋绕心血管	动脉球、心房、心室	心房分隔
神经管	神经板或神经褶	神经褶未融合	神经褶融合	后神经管形成，但开启	后神经管孔闭合
后脑	神经板	菱脑原节	前神经管孔形成，但开启	前神经管孔闭合、菱脑形成	明显第四脑室顶
中脑	神经板	中脑褶	中脑褶融合	中脑褶完全融合	明显区分中脑和后脑
前脑	神经板	前脑褶	前脑完全融合	明显端脑突	端脑半球
听觉器官	不可见	听原基	听凹	听泡	听泡和背部隐窝
嗅觉器官	不可见	视沟	视原基展长	原始视泡眼基开启	晶状体板凹陷
嗅觉器官	不可见	嗅板	可区分嗅板边缘	明显嗅脊	外侧鼻突和内侧边缘
鳃弓	无	第1对	第1,2对	第1,2,3对	第2对过度增长掩盖第3对
上颌突	无	明显上颌突	上颌突与鼻突融合		
下颌突	无	可见下颌突			
前肢芽	不可见	9～13体节处肢芽隆起	前肢芽	桨形肢芽	前肢芽顶端外突
后肢芽	不可见	26～30体节处肢芽隆起	后肢脑芽	桨形肢芽	
体节	0～6	7～13	14～2[illegible]	21～27	28～34

(3)反映胚胎组织器官形态分化的终点:衡量形态分化的评分方法比较系统的有Brown定量大鼠胚胎组织器官形态分化评分法(见表3 5)。对胚胎的外观选用了17项形态指标,主要包括:卵黄囊血管、尿囊、胚胎体位、心脏、前后神经管、后脑、中脑、前脑、听觉系统、视觉系统、嗅觉系统、鳃弓、上颌突、下颌突、前肢芽、后肢芽和体节数。然后按各个组织器官形态分化过程分为5个层次,分别赋予0~4分,各组织器官累积得分为总得分。总得分越低,说明胚胎形态发育越不正常,即化学物发育毒性作用程度越高。

(4)胚胎组织器官的病理学观察:体外培养的胚胎在进行活体检查后,经Bouin液、4%甲醛液或4%中性甲醛液(pH7.0~7.2)固定数h,脱水,透明,包埋,切片,HE染色,胞核呈蓝至蓝紫色,胞浆淡红或桃红色。可进行组织病理学观察评价,进一步了解胚胎组织器官和细胞的形态学改变。可引入各种先进的生物学标志(biomarkers)来指示胚胎的发育毒性效应。

7. 注意事项　WEC实验要求所有器皿,器械应及时严格清洗消毒,并严格按照无菌操作。

在抽血后,要立即离心。若耽误几分钟就可形成血凝块并逐渐释放出血清,此时再离心、制备的血清称为延迟离心血清(delayed centrifuged serum, DCS);如实验操作不当发生溶血,再经离心制备的血清称为溶血血清(hemolytic serum, HS)。DCS和HS不宜作为WEC用培养基,因其不利于体外培养胚胎的生长发育,对胚胎有发育毒性。

应按需要分装和取用冷冻保存的ICS,以避免反复冻融 因每次都需56 ℃灭活补体,反复灭活补体的ICS,不利于胚胎生长发育。

胚胎各层外膜剥离和移植是关系到体外WEC是否成功的重要环节之一。任何不正确的手术操作都可能对胚胎造成潜在的不良影响,而使最终的结果评价复杂化。因此,要求操作者尽全力控制各种影响因素、最大限度的减少人为误差,以保证获得最佳的实验结果。

(胡瑜华)

第四章

血液毒理学研究方法

第一节　特殊血液学检测

一、网织红细胞计数

(一) 原理

网织红细胞是介于晚幼红细胞和成熟红细胞之间的细胞。胞浆内还残留 RNA 等嗜碱性物质，黄焦油蓝等能将网织红细胞的胞浆染成蓝色花冠状、网状或点状结构。显微镜下易于识别和计数。

(二) 试剂

1%煌焦油蓝酒精溶液：准确称取煌焦油蓝 1.0g 溶解于 100ml 无水乙醇中，过滤后备用。

(三) 器材

载玻片、推片，滴管、显微镜

(四) 操作方法

1. 在清洁干燥玻片的一端加 1%煌焦油蓝酒精溶液 2 滴，等待其挥发后在玻片上形成一层油膜。

2. 取血液 2～3 滴(末梢或静脉血均可)，加到油膜上，立即用推片角将血液与煌焦油蓝充分混匀，然后推成薄片后在显微镜油镜下计数 1000 个红细胞中的网织红细胞数，将结果换算成网织红细胞百分数。为方便计数，可在目镜内放入网格计数器。正常参考值为

相对值：成人：0.5%～1.5%；儿童：2.0%～6.0%

绝对值：1.75 万～8.25 万/μl，平均值 6.0 万/μl

网织红细胞的绝对数计算：

网织红细胞数/μl＝(网织红细胞数%×红细胞数/μl)/100

(五) 临床意义

网织红细胞增加：表示骨髓红细胞增生旺盛，多见于溶血性贫血、恶性贫血、急性失血等；在对贫血治疗有效时，如用维生素 B_{12} 或铁剂治疗缺铁性贫血后网织红细胞数可在一段时间内明显增加。

网织红细胞减少：见于骨髓增生低下疾病，如再生障碍性贫血等。

(六) 注意事项

1. 取耳垂血、指端血或静脉血均可，但标本必须新鲜（不需抗凝），取血后立即进行活体染色。

2. 使用煌焦油蓝酒精溶液做染液，应等待玻片上酒精挥发干后才能加入血液，否则血液易于凝固。

二、红细胞渗透脆性试验

（一）原理

将红细胞悬浮于低渗溶液中时，因细胞膜两侧渗透压的差别使细胞外水逐渐进入细胞内，最后红细胞发生膨胀破裂而溶解。用本试验可测定红细胞对低渗溶液的抵抗力。

（二）器材和试剂

1. 10ml 干净试管，试管架、一次性消毒注射器。

2. 低渗 NaCl 溶液　先配置 1%的 NaCl 溶液，然后再通过梯度稀释成系列低浓度的溶液（通常 0.2%～0.8%）。

（三）操作步骤

1. 先配置系列低渗 NaCl 溶液，每试管 10ml。

2. 取受试者全血 1ml 在每管加入全血 1 滴，摇匀。应同时用正常者全血作对照。

3. 在室温中静置 2h，从渗透压高的一侧向低的一侧注意观察并记录各管上清液出现红色（表示发生溶血）的时间。观察试管底部红细胞完全消失（表示完全溶血）的盐水浓度和发生时间。

（四）正常参考值

开始溶血：0.42%～0.46% NaCl 溶液；完全溶血：0.28%～0.32% NaCl 溶液。与对照的结果相比，两者浓度差别应大于 0.0[illegible]%（也有认为差值应大于 0.08%）才有临床意义。

（五）临床意义

红细胞对低渗溶液的抵抗力（渗透脆性）取决于红细胞表面积和其容量即体积的比值。比值越大，抵抗力越强。正常红细胞可在低渗溶液中增加 70%的容量。红细胞脆性增加：见于遗传性球形红细胞增多症，自身免疫性溶血性贫血等。红细胞脆性降低：见于地中海贫血、缺铁性贫血，某些肝脏疾病如肝硬化和阻塞性黄疸等。

（六）注意事项

1. NaCl 低渗溶液的配置必须准确，现配现用。

2. 应每次用正常全血作对照。

3. 器材应干燥，避免操作过程造成的溶血。

4. 如因严重贫血等原因不易观察结果时，可将标本先离心沉淀并用生理盐水（等渗）洗涤红细胞，再用配成 50%的等渗悬液进行试验。

三、高铁血红蛋白含量测定

（一）原理

血中高铁血红蛋白在 630nm 处有一特殊吸收峰。加入氰化物后即形成氰化高铁血

红蛋白，该吸收峰也即消失。利用加入氰化物前后 630nm 处吸光度的变化可计算出高铁血红蛋白的含量。

（二）器材和试剂

1. 试管、吸管、40μl 毛细吸管、分光光度计。

2. 1 60mol L pH6 6 磷酸缓冲液：取 1 15mol L 磷酸二氢钾溶液 6.25ml，1 15mol L 磷酸氢二钠 3.75ml、双蒸水 30ml，充分混合，临用前配置。

3. 10%氰化钠溶液（剧毒！）

4. 5%高铁氰化钾溶液，贮于棕色瓶内。

5. 12%冰醋酸溶液

6. 中和的氰化钠溶液：取等量的 10% 氰化钠溶液和 12%冰醋酸溶液在临用前混合（在通风橱内操作！）。

（三）操作步骤

1. 在甲乙两试管中各加 pH6.6 磷酸盐缓冲液 4.0ml 和血样 40μl，混匀待红细胞充分溶解；在乙管中加 5%高铁氰化钾溶液 40μl，混匀，室温放置 5min 后在 630nm 处分别读取光密度 D1 和 D3。

2. 在两试管中各加入中和的氰化钠溶液 0.1ml，混匀后在 630nm 处分别读取光密度 D2 和 D4。

（四）结果计算

高铁血红蛋白百分率（%）＝（D1－D2）（D3－D4）×100

（五）临床意义

血红蛋白（Hb）分子中的 Fe^{2+} 可因多种原因氧化成 Fe^{3+}，这种带有 Fe^{3+} 的血红蛋白称为高铁血红蛋白（MHb）。正常红细胞中的 MHb 一般不超过 1%～2%，一些氧化剂如药物中的磺胺和苯的硝基或氨基化合物、亚硝酸盐等均可使 Hb 氧化成 MHb。当红细胞中 MHb 超过 10%时，常出现发绀。先天性 MHb 是指一些缺乏 MHb 还原酶或含有 MHb 者。

（六）注意事项

血样采集后应立即分析，如不能立即分析，用缓冲液稀释血样后置 2℃～4℃条件下可保存数小时。

四、变性珠蛋白小体测定（煌焦油蓝沉淀法）

（一）原理

变性蛋白小体是圆形或椭圆形的带有折光性的小颗粒，直径 0.3～2μm，大多分布在红细胞的边缘，一般一个红细胞中出现 1～2 个，也可在一个红细胞中出现数个。用煌焦油蓝与新鲜血液一起孵育作活体染色，变性珠蛋白小体可被染成蓝紫色。在油镜下计数含有变性珠蛋白小体的红细胞的百分数。

（二）器材和试剂

1. 载玻片和盖玻片，采血针，试管，毛细吸管，显微镜。

2. 1%煌焦油蓝染液：煌焦油蓝 1g，柠檬酸钠 0.4g，氯化钠 0.85g，加入适量双蒸水碾碎溶解后定容到 100ml，移入棕色瓶中保存，临用时先过滤。

（三）操作步骤

取0.3～0.5ml的1%煌焦油蓝染液置于小试管内，加新鲜末梢血2滴，混匀，加塞后置37℃水浴孵育2～3h，然后取出制成薄的血片。干燥后在油镜下至少观察500个红细胞，计数其中含有变性蛋白小体的红细胞数。

（四）临床意义

1. 正常红细胞中不含有变性珠蛋白小体。当血红蛋白被氧化时，血红素中的亚铁（Fe^{2+}）变为高铁（Fe^{3+}），形成MHb；珠蛋白分子中半胱氨酸侧链氧化变性形成变性珠蛋白小体，称赫恩（Heinz）小体，在HbH病时又称HbH包涵体。

2. 苯的氨基和硝基化合物中毒时，红细胞中可出现变性珠蛋白小体。

3. G-6 PD缺乏者、有不稳定血红蛋白病者若应用磺胺嘧啶、非那西汀等药物后发生溶血性贫血时，红细胞内常可见变性珠蛋白小体。然而，含有变性珠蛋白小体的红细胞常可被脾清除，因此，通常不易检查到。除非患者已做过脾脏切除。

（五）注意事项

1. 1%煌焦油蓝染液如含有颗粒，易造成假阳性。

2. 制片风干后应及时计数，存放过久变性珠蛋白小体可消失。

3. HbH包涵体（颗粒细而均匀）应与网织红细胞鉴别。

五、血液细胞的化学染色

根据细胞内各种生物大分子的结构和理化性质不同，可以采用各种染色方法使这些分子在细胞原位显示，从而为我们进一步观察和了解细胞的生理、生化和病理改变并为疾病或有关中毒危害等的诊断和进一步深入研究其分子机制等提供直观而有用的依据。由于方法的种类甚多、用途各异，这里仅作综合描述。

用途与方法：

1. 用于细胞内各种酶的显示　如粒细胞过氧化物酶染色法（POX），琥珀酸脱氢酶染色法，乳酸脱氢酶染色法和水解酶染色法可用于白血病的鉴别诊断；

2. 用于细胞内各种蛋白质的显示　蛋白质结合硫氢基染色法和碱性蛋白染色法用于显示细胞内蛋白结合巯基，对白血病诊断也有一定参考价值。

3. 细胞内DNA和RNA染色　除用于白血病鉴别诊断外，还可用于电离辐射损伤的辅助诊断；DNA染色可用于鉴别巨幼红细胞和幼红细胞；RNA染色对于诊断巨幼红细胞贫血、恶性贫血、溶血性贫血和缺铁性贫血也有帮助。

4. 用于显示细胞内各种糖类的染色法　各种不同细胞或其不同发育阶段细胞内糖类或多糖物质的种类和含量不同，因此可用糖类染色法鉴别细胞的种类或所处发育阶段，以此帮助诊断某些血液疾病，特别是用于白血病的鉴别诊断。

5. 用于显示细胞内脂类的染色法　如苏丹黑染色法和油红O染色法等，主要用于急性白血病的鉴别诊断。

6. 用于显示细胞内的无机盐类　铁染色法用于诊断缺铁性贫血和铁粒幼红细胞性贫血等。

六、血液细胞的免疫细胞化学染色

本方法是将免疫学原理应用于检测血液细胞中特殊抗原分子的一类实验技术。应用抗原-抗体结合的原理，选择特殊抗体可和涂片血细胞中靶分子结合。由于抗体分子上带有可识别的标记如发色基团、荧光素或某种酶，因此可依靠这些标记物或酶催化的底物反应所产生的颜色深浅及其在细胞中的位置，来判断该靶分子在细胞中的表达水平和分布特征。鉴于这类方法通常较敏感又很特异，操作也较简单，已广泛用于研究血细胞的起源、细胞的增殖和分化、细胞中相关基因的表达和调节、白细胞的免疫分型等。为提高敏感性和特异性，既可将标记物或酶分别与一抗、二抗或三抗连接，也可直接用合成的抗原抗体复合物进行检测，这些方法各有特点。以辣根过氧化物酶复合物免疫酶标法(peroxidase-anti-peroxidase，PAP)为例，三种连接法分别称为直接法、间接法和抗体-酶桥联法，操作过程和特点可简单表示如下：

1. 直接法　靶分子(抗原)+酶标记的抗靶分子抗体→抗原-抗体复合物+底物→产生颜色反应→显微镜下观察颜色深浅和在细胞内的定位。特点：操作简单，特异性强，敏感性差。

2. 间接法(夹心法)　靶分子(抗原)+一抗→抗原-抗体复合物+酶标记的抗一抗分子的抗体(二抗)→抗原-抗体-抗体复合物+底物→产生颜色反应→显微镜下观察颜色深浅和在细胞内的定位。特点：敏感性强，特异性稍差。

3. 抗体-酶桥联法　靶分子(抗原)+一抗→抗原-抗体复合物+抗一抗分子的抗体(二抗)→抗原-抗体-抗体复合物+酶标记的抗二抗抗体(三抗)→抗原-一抗-二抗-三抗复合物+底物→产生颜色反应→显微镜下观察颜色深浅和在细胞内的定位。特点：特异性强，敏感性高。但三抗要高度纯化。

除辣根过氧化物酶复合物免疫酶标法外，常用的还有亲和素-生物素-过氧化物酶复合物免疫酶标法(avidin biotin perooxidase complex，ABC)，链霉亲和素-生物素免疫酶标法(labeled strepavidin biotin，LSAB)以及碱性磷酸酶-抗-碱性磷酸酶复合物免疫酶标法(alkaline phosphatase-anti alkaline phosphatase，APAAP)等。不同方法的原理和使用范围相似，可根据实际情况选择使用。

七、免疫细胞表面标志的检测

免疫细胞包括淋巴细胞、单核吞噬细胞、自然杀伤细胞和抗原递呈细胞，也包括中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞、上皮细胞和血小板等。细胞表面标志即为一些细胞膜上的蛋白质分子，有些分子是多种细胞共有的，但也有些分子是某(亚)群细胞甚至是某亚群细胞特定发育或分化阶段的特征性标志。这些免疫细胞表面的分子统称为分化簇(cluster of differentiation，CD)，因此，通常称CD标志。迄今已发现免疫细胞表面的CD标志有近200种，这些CD标志已被广泛用于临床血液疾病特别是各种白血病的临床辅助诊断和实验研究。

检测CD标志的方法有免疫荧光染色法、流式细胞分析法和免疫细胞化学法等。这些方法的原理主要是利用荧光素或酶标记的CD抗体与细胞表面特异性CD抗原结合生成抗原-抗体复合物，然后利用显微镜直接观察或用流式细胞仪进行检测，后者仅适用于

检测荧光素标记的细胞。

八、血液细胞凋亡的检测

细胞凋亡(apoptosis)是机体按自身程序识别和驱除不需要细胞的一种有效手段,因此也称为程序性细胞死亡或编程性细胞死亡(programmed cell death,PCD),与细胞坏死(necrosis)的发生机制和形态学表现均不同。细胞凋亡大多由生理性因素引起,其发生需要消耗能量,往往有新的基因表达和蛋白质合成增加。其形态学特征为:细胞膜完整,细胞核固缩、碎裂,最后被吞噬细胞或邻近细胞所识别和吞噬。细胞凋亡常常发生于单个细胞,不引起炎症反应和次级损伤。凋亡细胞内生化反应的基本特征是核酸内切酶的激活将细胞核内DNA在核小体单位间发生降解,从而产生长短不一的寡核苷酸片段,这些片段经琼脂糖凝胶电泳分离后用溴乙锭染色,然后在紫外线灯照射下在呈现梯状DNA条带(DNA ladder)。这些梯状条带是180~220个碱基对整倍数的寡核苷酸片段,也就是核小体的重复单位。血液细胞发生凋亡很活跃,而诱导白血病细胞凋亡已经作为常用的治疗白血病的一种手段。

对细胞凋亡的检测包括形态学、生物化学、免疫化学和分子生物学等多方面,已发展了许多方法和技术。形态学检测可用普通显微镜[HE染色、苔盼蓝(trypan blue)染色、Giemsa's染色以及甲基绿-派诺宁染色法等]、荧光显微镜[吖啶橙染色法、碘化丙啶(propidium iodine,PI)染色法]和电子显微镜(透射电镜或扫描电镜)等不同方法;生物化学检测常用琼脂糖凝胶电泳技术分析DNA梯度、^{32}P ATPDNA标记法、脱氧核糖核苷酸末端转移酶(TdT)DNA标记法、^{3}H TdR或^{125}I UdRDNA标记法等,以及其他一些测定DNA或染色体断裂的方法;用酶联免疫吸附法(ELISA)测定凋亡细胞,可大大提高检测的灵敏度;分子生物学检测细胞凋亡主要是根据DNA单链或双链断裂时因出现缺口而形成一系列的DNA 3′OH末端,在TdT作用下,可将脱氧核糖核苷酸和荧光素、过氧化物酶、生物素以及碱性磷酸化酶等形成的衍生物标记到该末端,从而可以方便地进行检测。这些脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(terminal deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling,TUNEL)即通常简称的TUNEL法。细胞发生凋亡的过程受许多基因的调节,因此检测细胞内某些与凋亡有关的基因(如Bcl-2,caspase-3)表达(mRNA和蛋白质水平)也是常用的分子生物学检测技术。

九、细胞遗传学和分子生物学检测

对造血系统的细胞遗传学检测主要是指对白细胞的染色体分析。染色体分析是白血病诊断、分型和开展分子机制研究的重要手段。染色体显带(核型分析)技术就是使用不同试剂和染色方法处理后,用光学显微镜可观察到处于分裂中期细胞的染色体呈现明暗相间的条纹。该技术用于识别每条染色体并可检出染色体上的病变和重排等。

常用的显带技术有Q带、G带、R带、C带和T带等染色法。各种显带技术所用的染色方法和原理各异,如Q显带技术是依据荧光染料氮芥喹吖咽(QM)能和A-T碱基特异性结合,而G显带技术是用胰酶消化处理抽提出染色体上疏水性的阳性G带区蛋白质,再以Giemsa染色显示等。正常人的染色体有其特征性的分带谱,如发生染色体易位、缺失等用此技术易于识别。

除了核型分析外，其他染色体分析技术还有姊妹染色单体交换(sister chromatid exchange,SCE)分析、性染色质分析和染色体脆性位点显示等。荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization,FISH)分析技术则是用荧光染料标记某个靶基因或其片段，通过杂交技术以显示在待检标本中该基因的染色体定位，已广泛用于新基因研究和疾病诊断中。现已知多种白血病有特征性的白细胞染色体异常，一些基因的易位和重排后形成新的致病性的融合基因，其中多数还形成新的融合蛋白，成为诊断、确定治疗方案、判断治疗效果和预后的重要生物标志物。使用FISH技术或逆转录聚合酶链式反应(reverse transcriptase-polymerase chain reaction,RT-PCR)技术、蛋白质印迹(Western blot)技术等可分别对这些融合基因进行定性、定位和转录及水平的定量分析。可以预见，随着新的细胞遗传学和分子生物学新技术，特别是高通量分析技术的不断出现和应用，将为血液系统疾病的快速、准确的检测和诊断提供更多更科学的手段。

第二节 血液和骨髓毒物筛选试验

进行新药临床前安全性评价时，血液毒性是最主要的指标之一。与整体模型相比，体外造血模型具有方便、受试物用量少、费用少、实验周期短等优点；体外细胞系分析还可用于同时研究几种不同化合物的联合作用，以及用于确定不同种属的动物的相对敏感度。后者对于确定使用哪种动物模型作为毒性研究很有帮助。因此，体外模型已被广泛用于药物的临床前筛选试验，尤其是用于各种抗癌和抗病毒药物的临床前开发研究中。有些需要代谢活化的抗肿瘤化学物也可在体外进行评价，如果代谢物的性质稳定，即可直接使用；如代谢物性质不稳定，则可用另一种细胞先产生代谢物，然后再评价这些代谢物的作用。

一、骨髓造血细胞的体外培养

造血干细胞在体外生存和增殖依赖于一个良好的造血微环境，骨髓基质细胞及其分泌的细胞外基质(包括蛋白多糖、糖蛋白和胶原)和造血生长因子(如IL-1、IL-3、IL-4、IL-6、IL-7、IL-11、GM-CSF等)，可以为造血干细胞的生长、增殖、分化等提供支持。使用志愿者的骨髓作体外造血细胞培养时通常从其髂后上嵴抽取，用肝素抗凝后进行细胞分离。用分离出的造血细胞按照实验目的建立不同的培养体系，如研究髓系造血大多采用Dexter培养体系；研究红系造血时，使用促红细胞生成刺激素；研究淋巴造血时，用Whitock-Witte培养体系等。也可用小鼠股骨骨髓建立体外造血细胞培养体系。

骨髓基质细胞培养也就是在体外培养体系中营造一个与体内造血微环境相似的条件，以支持造血细胞的长期生长。通常在有骨髓基质细胞存在的情况下，造血干细胞可在体外培养几个月。

二、体内试验 白血病实验动物模型

因为动物的血液系统与人类相似，动物白血病研究可为探讨人类白血病的病因、发生发展规律、治疗和预防等提供有价值的资料。按照动物白血病的产生原因，通常将动物白血病模型分为自发性、可移植性、诱发性和转基因性四种。自发性白血病主要发生于一

些近交系的小鼠,如C58小鼠、Afb小鼠,AKR小鼠等;在诱发性白血病模型中,除病毒(如MuLV,AMV,BLV等)外,物理因素(如电离辐射)、化学因素[如DMBA(9,10二甲基苯丙蒽),BNU(硝基脲),myleran(马利兰),B(a)P(苯并芘)等]和一些抗肿瘤药物(如6巯基嘌呤,雌激素,氨基甲酸乙酯等)都是常用的诱导因素;可移植性白血病模型又分为同种可移植性和异种可移植性;而转基因性动物模型是将外源性致白血病基因导人和整合到小鼠染色体基因组内或使靶动物基因组中某个特定基因剔除,使动物发生白血病,通常这种改变的遗传特征能够遗传给后代动物。

用于诱发动物白血病的化学物中,以DMBA和BNU的作用较强。DMBA诱发大鼠和小鼠的白血病大多为原红细胞型,大鼠诱发率为50%~80%(TR 1近交系)或更高(Lang Evans,LE大鼠可达80%~100%)。对BALB c小鼠的诱发率也较高。用DMBA和马利兰在615近交系小鼠诱发的白血病主要为胸腺瘤和胸腺瘤型白血病。

电离辐射诱发小鼠白血病模型的效果与照射方案的设计有关,已证明低剂量多次全身照射可使低白血病系小鼠发病率明显提高,实验鼠年龄越小越敏感。如同样的照射方案用于诱发C57BL 6小鼠白血病,1月龄鼠的发病率为95%,6月龄鼠发病率仅33%。电离辐射在C57BL 6小鼠主要诱发胸腺瘤和胸腺瘤型白血病,而在615小鼠则诱发淋巴细胞性白血病。

已知一些种类的白血病的发生与某个特定基因的改变,如产生新的融合基因或基因突变和缺失有关,因此可将在体外对这些特定基因进行人工改造,并用来建立我们希望的某种特定类型的动物白血病模型。转基因动物白血病模型主要通过受精卵原核注射技术、胚胎干细胞(embryonic stem cells,ESC)基因操作技术(如基因打靶、基因剔除等)以及造血干细胞基因操作技术等构建。如利用构建的BCR ABL融合基因建立小鼠Ph阳性的髓性白血病动物模型。

(周建伟)

第五章

免疫毒理学研究方法

第一节　免疫毒性研究实验设计

外源化学物的免疫毒性研究一般是根据受试物的种类和特点以及实验室的条件，选择某种检测方案中的一组试验，对研究结果进行综合分析。在免疫毒性试验设计中，除了应遵循毒理学试验的一般原则外，还要注意一些相对特殊的问题，其中主要有以下几个方面。

一、实验动物的选择

一般采用啮齿动物，尤以小鼠最为常用，主要是因为：①人们对小鼠的免疫系统了解得最充分，拥有的相关资料最多；②比其他大动物饲养更方便、更经济；③容易获得有关的试剂，如细胞因子、抗体等。现在有些研究规范要求在检测化学物常规毒性的同时检测其免疫毒性，因此各国都在研究和评价大鼠模型在免疫毒性检测中的应用问题。除了少数功能研究外，在评价免疫力方面，大鼠与小鼠模型基本相似。药物免疫毒性试验可能用新药毒理学研究常用的非啮齿动物狗或猴。外源化学物免疫毒性试验有时为了更好地外推，也可以采用恒河猴（rhesus）或狝猴等。多数人用的免疫试剂可以直接用于灵长类动物。其他常用的实验动物还有鸡和鱼类等，其中鱼类是检测环境污染物免疫毒性的良好模型，常用于生态毒理学研究。

由于免疫反应的复杂性和个体差异性，有条件的实验室应该尽量选用近交系动物，以减少个体差异对实验结果的影响。如果使用杂交品系，应增加每组动物数。要尽量选择遗传基因或表型比较明确的品系，最好是已知对待测化学物敏感的且反应性与人类接近的品系，这就需要了解待测化学物代谢和毒作用机制方面的相关知识，有时难以做到。美国 NTP 推荐用 B6C3F1 小鼠。对于大多数临床免疫抑制剂来说，在啮齿动物免疫毒性试验中发现的靶器官和免疫抑制剂量与临床观察结果具有可比性，但也有一些例外。如糖皮质激素对啮齿动物具有淋巴细胞溶解作用，但对灵长类却没有这种作用。关于实验动物的年龄，一般选择成年动物，但也可根据不同的研究目的选择不同年龄的动物。

二、接触外源化学物的剂量、途径和时间

在免疫毒理学试验中，选择合适的剂量是获得可靠的实验结果，并对结果进行合理解释和外推的重要前提。选择剂量的原则是可以得到明确的剂量-反应关系和未观察到有

害作用的剂量(NOEAL)。为此至少应设3个或5个以上剂量组。高剂量组不应产生严重的毒性反应,一般应低于LD_{50}。剂量过高可因全身毒性反应或其他器官的毒性影响免疫应答,对这样得到的结果进行解释时要多加小心。低剂量不应出现免疫毒性。正式试验前最好先进行预试验,以确定剂量范围。

值得注意的是免疫毒性的剂量-反应关系比较复杂,尤其是外源化学物引起的各种超敏反应,往往没有典型的剂量-反应关系,更重要的决定因素是个体敏感性。比如青霉素引起的超敏反应,不敏感人群每天静脉注射上千万单位也不会出现超敏反应,而敏感者可以在皮试时就出现严重的过敏性休克甚至死亡。外源化学物引起的接触性皮炎和过敏性哮喘虽然存在一定的剂量-反应关系,但发病与否主要跟个体敏感性有关,而不完全取决于接触剂量。外源化学物引起的自身免疫性疾病也与个体敏感性密切相关,动物实验和人群研究都发现某些遗传表型的个体容易出现自身免疫性疾病。相对来说,外源化学物引起的免疫抑制一般都有明确的剂量-反应关系。但免疫毒性的剂量-反应关系不一定是线性的,可以表现为"U"形、"J"形或其他类型。因此,在动物实验结果外推过程中要特别注意剂量问题,相对高剂量的动物实验得到的结果,有时难以直接外推到人群低剂量长期接触的情况。

近年来,毒理学家比较重视毒物兴奋效应或毒物刺激作用(hormesis),表现为低剂量有刺激作用,高剂量才出现抑制。这种现象也可以出现在免疫毒性反应中。在低剂量辐射研究中已经证实存在低剂量兴奋效应,也称为辐射激效。低剂量电离辐射照射后不是出现免疫抑制,而是出现免疫增强作用,表现为T细胞,尤其是T_H细胞活性增强、IL-2等细胞因子产生增加、脾细胞溶血空斑形成(PFC)反应和NK细胞活性增强等。只有当辐射剂量增加到一定程度才引起免疫抑制。从理论上讲,外源化学物的免疫毒性也可能存在低剂量兴奋效应,虽然目前还很少有这方面的研究报道,但在免疫毒物的危险度评价中仍应重视这个问题。

接触外源化学物的途径应首先选择与人类实际接触相同的方式,通常是口服、经呼吸道或经皮肤接触。其他如皮下、腹腔和静脉注射等途径一般用于机制研究。实验动物接触外源化学物的时间长短,对免疫系统也可以产生不同的影响。在免疫毒性试验中,可以根据人们实际接触时间的长短确定接触时间。在免疫毒性评价中,低剂量长期接触观察到的结果,比高剂量短期接触得到的结果更有参考价值。

药物免疫毒性试验有时不是完全按照标准程序进行,而需要做一些适当的修正,使给药剂量、给药途径和持续时间尽量与非临床毒理学研究相一致。

三、重视局部免疫功能的检测

在免疫毒性试验中,经消化道、呼吸道和皮肤接触外源化学物后,除了影响全身免疫功能外还能影响局部免疫功能,如肠粘膜淋巴组织、皮肤和肺部的单核-巨噬细胞和淋巴细胞都能参与免疫应答,有时对局部免疫功能的影响更为明显。因此在免疫毒性评价中,应该重视外源化学物对局部免疫功能,尤其是肺部免疫功能的影响。最近Ban等报道,用IgM对绵羊红细胞反应(PFCs)和γ-干扰素(IFN-γ)生成两种免疫功能试验,比较吸入有机溶剂对局部免疫功能和全身免疫功能的影响。小鼠吸入不同浓度的氯仿、四氯化碳、二氯乙烯和苯乙烯后,观察脾淋巴细胞和肺部淋巴结的IgM反应和IFN-γ生成。结果至

少1种以上浓度的上述各种化学物能引起肺部淋巴结细胞的PFCs数增加，而只有最高浓度的二氯乙烯能引起脾淋巴细胞的PFCs数增加。培养的肺部淋巴结细胞产生的IFN-γ是对照组的600%以上，而脾淋巴细胞产生的IFN-γ只略高于对照组。说明肺部淋巴结是吸入上述有机溶剂的靶组织，而系统免疫功能检测（脾淋巴细胞PFCs和IFN-γ生成）不能很好地反映上述化学物对局部免疫功能的影响。在新药免疫毒性研究中，要观察口服给药的肠道淋巴组织；吸入给药的支气管相关淋巴组织；吸入或滴鼻给药的鼻淋巴组织；皮肤给药和肌肉、皮下、皮内注射的局部回流淋巴结。

第二节 免疫抑制检测方法

一、体液免疫功能测定（溶血空斑试验）

（一）实验目的

了解外源化学物引起实验动物B细胞活化能力和抗体生成能力改变的评价方法，掌握琼脂固相法溶血空斑试验检测抗体形成细胞的方法。

（二）基本原理

溶血空斑试验是一种体外检测抗体形成细胞（PFC）的方法。将SRBC免疫的小鼠脾细胞与一定量的SRBC（靶细胞）混合后，脾细胞中的抗体形成细胞与SRBC结合，抗体形成细胞分泌抗绵羊红细胞抗体（溶血素），在补体参与下，使周围受到抗体分子致敏的SRBC溶解，形成肉眼可见的溶血空斑。目前所用的方法有琼脂固相法和液相法，前者是以一定浓度的琼脂为支持物，在琼脂平皿中计算溶血空斑数；后者将SRBC、免疫小鼠的脾细胞和补体直接加入玻片小室中，使细胞成单层，计数溶血空斑，此法目前已很少使用。本实验采用琼脂固相法。

（三）试剂与器材

1. Hanks液。
2. 20%SRBC悬液（用Hanks液配）。
3. 补体 新鲜豚鼠血清（用前经靶细胞吸收，1ml压积SRBC加20ml补体，置4℃，20min，2000 r/min离心5min，取上清，用Hanks液稀释为1∶10，分装，-70℃保存，有效期至少1.5年）。
4. 右旋糖酐（DEAE dextram，分子量为50万） 用蒸馏水配置10mg/ml，其作用是阻止琼脂的抗补体作用。
5. 琼脂或琼脂糖（表层琼脂0.7%，底层琼脂1.4%，用Hanks液配）。
6. 胎牛血清（56℃ 30min灭活，并经绵羊红细胞吸收）。
7. 苔盼蓝（0.4%）。
8. 47℃～49℃水浴箱、1ml注射器和青霉素小瓶、玻璃平皿（7cm×1.5cm）、血细胞计数板、小试管、剪刀、镊子、冰块、离心机、离心管、过滤网、倒置显微镜、微量移液器、吸管等。

（四）操作步骤

1. Hanks液配置的1.4%底层琼脂加热融化后倾注平皿内，成一薄层，待凝固备用。

2. 每管含 2ml 0.7% 表层琼脂的试管加热融化后，放在 47℃～49℃水浴保温。

3. 免疫小鼠脾细胞悬液的制备

(1)SRBC 免疫小鼠：最好用纯种小鼠，6～8 周龄，18～22g，腹腔或尾静脉注射绵羊红细胞 4×10^8 个/ml。测定直接溶血空斑，用免疫后 4 天的小鼠(用来检测分泌 IgM 的抗体形成细胞，为直接法)；测定间接溶血空斑，用免疫后 10 天的小鼠(用来检测分泌 IgG 的抗体形成细胞，为间接法)。同时设不致敏对照组。

(2)免疫小鼠颈椎脱臼处死，取出脾脏放在周围有碎冰块的青霉素瓶中，先剪碎，再加冷 Hanks 液数毫升，用吸管吹打，使细胞分散均匀。过滤网(100 目)过滤，离心弃上清，将细胞用冷 Hanks 液洗涤两次，再将沉淀的细胞重悬于 1ml 冷 Hanks 液内，置冰浴中。

(3)细胞用白细胞计数法计数，并用苔盼蓝检查活细胞的百分率，按照活细胞百分率(应在 90%以上)将脾细胞配成 5×10^6～10×10^6 个/ml 浓度的细胞悬液。

4. 试验平皿的制备　将底层平皿和所有试剂(除脾细胞外)预热至 40℃左右。在 0.7%表层琼脂管中，依次加入右旋糖酐 0.1ml、胎牛血清 0.1ml、20%SRPC 悬液 0.1ml、脾细胞悬液 0.1ml。迅速将小试管在水浴中振荡使各成分混匀，立即倾入经预温 40℃的底层琼脂面上，立即在水平台上轻轻旋转使之均匀平衡，凝固后 37℃温育 1 h。

5. 加补体　于每个平皿内加入 1∶10 稀释的补体 1.5～2ml，37℃继续保温 30min，于室温下放 1h，4℃冰箱过夜，次日倾去补体，即可用肉眼或放大镜观察溶血空斑，并计数。如需保存，可加入用生理盐水或 PBS 配制的 0.25%戊二醛加以固定。

(五) 结果评定

将平皿划分小格，用放大镜观察可见每个空斑由抗体分泌细胞及其周围的透明区组成。计数每个平皿 1×10^6 个细胞中的溶血空斑数即 PFC/10^6 脾细胞，也可用 PFC/全脾表示，并计算每组动物溶血空斑均数，进行 t 检验或方差分析。如果 PFC 减少并有剂量效应关系，表明有免疫抑制作用。

(六) 注意事项

1. SRBC 既是免疫细胞，又是靶细胞和指示细胞，故 SRBC 要新鲜，洗涤不得超过 3 次，每次离心 5min。细胞变形或脆性增大不能使用。用 Alsever's 液 4℃保存的 SRBC 可使用 2 周。

2. 为了消除非特异性溶血，豚鼠血清在使用前必须经 SRBC 吸收，补体的浓度以 1∶10 稀释为最适宜。

3. 制备脾细胞悬液时，若将取出的脾立即放入 0℃冰浴，可明显降低空斑计数；在 20℃以下操作不超过 15min，对空斑计数并无影响。

4. 抗 IgG 或抗 IgA 血清可以显示间接空斑，而抗 IgM 血清可抑制直接空斑的形成。故显斑血清中，若混有少量的抗-μ 或抗 Fab 的抗体存在，就可以抑制直接空斑的出现。因而需测定抗血清的显斑常数(KD)和抑斑常数(KI)，作为空斑计数的校正。

5. 倾注底层琼脂时，一定要将平皿放置水平位置，以便使底层琼脂水平光滑。倾表层琼脂时，各种细胞成分要充分混匀。不能剧烈振荡，以免出现空泡。水浴温度应控制在 47℃～49℃之间，温度过高使细胞变性；过低使琼脂凝固，影响细胞的分散。

二、淋巴细胞增殖试验(MTT 比色法)

(一) 实验目的

掌握脾淋巴细胞悬液的制备和检测体外培养的淋巴细胞增殖的方法(MTT 比色法)。

(二) 基本原理

体外培养的淋巴细胞在有丝分裂原刺激下被活化增殖,加入染料四甲基偶氮唑盐(MTT)后能被活细胞代谢产生紫色的甲臜(formazan),用酶标仪直接测定各孔的吸光度(A),可反映甲臜的量,由此推断细胞内线粒体氧化酶活性,间接反映活细胞的数目,即淋巴细胞的增殖水平。

(三) 试剂和仪器

1. MTT 用含 0.5%葡萄糖的磷酸缓冲液(0.02mol/L,pH 7.2)配成 5mg/ml 使用液,4℃避光保存。

2. 酸化异丙醇 含 0.04mol/L 的异丙醇。

3. 全价 RPMI 1640 培养液。

4. 致分裂原 LPS 和 PHA 或 ConA。

5. Hanks 液。

6. CO_2 培养箱、酶标仪、振荡器、离心机、离心管、96 孔培养板、微量移液器、剪刀、镊子、5ml 注射器、不锈钢滤网(60~100 目,孔径 0.28~0.154mm;150 目,孔径 0.1mm;600 目,孔径 0.02mm)等。

(四) 操作步骤

1. 脾细胞悬液的制备 将小鼠股动脉放血处死,取脾,剔除结缔组织和脂肪并剪碎脾脏,将碎脾组织置于平皿内的不锈钢滤网(60~100 目,孔径 0.28~0.154mm)上,一手持网,另一手用注射器的针芯轻轻压挤脾组织,使单个核细胞经网进入平皿内的 Hanks 液中。吸取 Hanks 液冲洗网。将细胞悬液再依次通过 150 目(孔径 0.1mm)和 600 目(孔径 0.02mm)的不锈钢滤网以便形成单个细胞悬液。离心(2000r/min,5min)后低渗处理去除红细胞,再次离心洗涤,重悬细胞,细胞计数,调整细胞浓度为 1×10^7/ml。以上操作过程均在 0℃~4℃下完成。

2. 加入 96 孔细胞培养板,每孔 100μl(1×10^6 细胞/孔)。

3. 加入含不同浓度致分裂原的 RPMI-1640 培养液 100μl,置 5%CO_2,37℃培养 48h。每个浓度设 3 个复孔。

4. 轻轻吸弃上清 100μl。

5. 加入 MTT 溶液(5mg/ml)10μl(50μg/孔),于振荡器上振荡 1min。

6. 放置 5%CO_2,37℃培养箱反应 2 h。

7. 取出反应物,离心(2000r/min,5min),弃上清。

8. 每孔加入酸化异丙醇 120μl,振荡器上振荡 30 s。

9. 用酶标仪在 570nm 处读取 A 值。

(五) 结果判定

将丝裂原刺激组和对照组各自的平均 A 值,代入下式计算出刺激指数(SI):SI = 刺激组的 A 值÷对照组的 A 值。

(六) 注意事项

1. 在 MTT 反应结束并离心后,应轻轻吸弃上清液,避免已形成的甲臜颗粒丢失。

此外，用酸化异丙醇溶解甲臜颗粒，可避免因残留酚红而干扰比色。

2. 丝裂原剂量太大，对细胞有毒性，太小则不足以刺激淋巴细胞的转化。因此，每次使用新批号的丝裂原时，都应重新测定其合适的浓度。

3. MTT比色法与^{3}H-TdR掺入法比较，两者平行相关，相关系数在0.9以上)。MTT比色法具有简单、快速、敏感的优点。本法无须收集及洗涤细胞，而是直接在细胞培养孔中加入MTT。

4. 根据实验需要，对不同种系(人、小鼠、大鼠等)、不同来源的淋巴细胞(胸腺、脾脏、外周血等)均应进行最适细胞浓度、培养时间的摸索。

三、细胞免疫功能测定(皮肤迟发型超敏反应,DTH)

(一) 实验目的

观察外源化学物引起实验动物T细胞依赖的迟发型超敏反应的改变，评价外源化学物对细胞免疫功能的影响。

(二) 基本原理

二硝基氟苯(DNFB)是一种半抗原，将其稀释液涂抹小鼠腹壁皮肤后，与皮肤蛋白结合成完全抗原，刺激T细胞增殖成致敏淋巴细胞。4～7天后再将其涂抹于小鼠耳部或足爪皮肤，使局部产生DTH，于抗原攻击后24～48 h(此时反应达到高峰)测定局部肿胀度，以反映迟发型皮肤超敏反应的强度。

(三) 试剂和器材

1. DNFB溶液(配制见操作步骤)。

2. 丙酮麻油溶液：丙酮：麻油＝1：1。

3. 青霉素小瓶、1ml注射器、电子天平、剪刀、胶布、打孔器。

(四) 操作步骤

1. DNFB溶液的配制　DNFB应新鲜配制。如欲配制1%DNFB 5ml，可称取DNFB 50mg，置清洁干燥的青霉素小瓶中，将预先配制好的5ml丙酮麻油溶液倒入小瓶，盖好并用胶布密封，混匀后，用250μl注射器通过瓶盖取用。

2. 致敏　选用615或ICR小鼠，随机分为对照组和给药组(包括药物溶媒组)。除抗原攻击的对照组外，每鼠腹部去毛，范围约为3cm×3cm，并将1%DNFB丙酮麻油溶液50μl均匀涂抹致敏，必要时于第二天再强化一次。

3. DTH反应的产生与测定　5天后将1%DNFB溶液10μl均匀涂抹于小鼠右耳(两面)进行攻击，对照组同样涂耳但未致敏。攻击后24h，颈椎脱臼处死小鼠，剪下左右耳壳，用打孔器取下直径8mm的耳片，称重。以左右耳重量之差为肿胀度。同时取小鼠胸腺及脾脏称重。分别以每10g小鼠的脾重(mg)和胸腺重(mg)作为脾指数和胸腺指数。

(五) 结果评价

统计比较用药组和药物溶媒组与对照组有无显著性差异。

(六) 注意事项

1. 在小鼠腹部剪毛区域应尽量去毛，且应该避免剪破皮肤。

2. 实验过程中环境温度控制在(20±2)℃为宜。操作时应避免DNFB与皮肤接触。

3. 可用环磷酰胺于致敏前(250mg/kg)或致敏当天(150mg/kg)注射诱导DTH增高或降低模型,以便观测化学物的调节作用。

4. 亦可用此模型检测抑制性T细胞的功能。

四、NK细胞活性测定(乳酸脱氢酶释放法)

(一) 实验目的

通过NK细胞活性测定,评价外源化学物对机体固有免疫功能的影响。

(二) 基本原理

乳酸脱氢酶(LDH)存在于细胞内,正常情况下,不能透过细胞膜。当细胞受到损伤时,由于细胞膜通透性改变,LDH可从细胞内释放至培养液中。释放出来的LDH在催化乳酸生成丙酮酸的过程中,使氧化型辅酶I(NAD^+)变成还原型辅酶I(NADH),后者再通过递氢体-吩嗪二甲酯硫酸盐(PMS)还原碘硝基氯化氮唑盐(INT)或硝基氯化四氮唑盐(NBT)形成有色的甲臜,在490nm或570nm波长处有一吸收峰,测定吸光度(A),可反映NK细胞活性。

(三) 试剂与材料

1. PBS(pH 7.4) NaCl 8.0g,KH_2PO_4 0.2g,$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 2.9g,KCl 0.2g,加去离子水至1000ml溶解。

2. 1mol/L乳酸钠溶液 取11.2g乳酸钠溶于100ml去离子水。

3. LDH底物溶液(临用前配) NBT 4mg,NAD^+ 10mg,PMS 1mg,加蒸馏水2ml溶解,混匀后取上清液1.6ml,加1mol/L乳酸钠0.4ml,然后加入PBS(pH 7.4)至10ml。

4. 1% NP-40 取1ml NP-40加去离子水99ml。

5. RPMI 1640培养液,10% FCS-RPMI-1640培养液。

6. 1mol/L枸橼酸终止液 取枸橼酸4.2g加去离子水20ml溶解。

7. Tris-NH_4Cl溶液 NH_4Cl 3.735g/450ml双蒸水+Tris 1.3g/50ml双蒸水(pH 7.65)。

8. 0.5%台盼蓝溶液。

9. 靶细胞 YAC-1细胞株(小鼠NK细胞敏感株)或K562细胞株(人NK细胞敏感株)。

10. 效应细胞 小鼠脾细胞或人外周血淋巴细胞。

11. 酶标板、CO_2培养箱、显微镜、离心机、微量移液器、试管、吸管、酶标仪、细胞培养板、剪刀、镊子、注射器、平皿和酒精等。

(四) 实验步骤

1. 靶细胞制备 取传代培养24~48 h对数生长期的YAC-1细胞,用RPMI-1640培养液洗涤2次,1000r/min离心5min。10% FCS-RPMI 1640培养液重悬细胞,并用0.5%台盼蓝染色检测细胞存活率≥95%,调整细胞浓度至1×10^5/ml。

2. 效应细胞制备 将小鼠颈椎脱臼处死,用酒精棉球消毒腹部,无菌取出脾脏,除去脂肪等,放入加有约5ml PBS液的平皿中,用5ml注射器抽取平皿内液体缓缓注入脾脏内,将脾细胞冲洗出来。如此反复冲洗,直到脾脏变白为止(约冲洗5~6次),将细胞移入离心管内,离心洗一次。加5ml红细胞裂解液,冰浴下裂解10min,每2min摇动一次,

1000r min 离心 5～1 min，重复洗一次，用 10% FCS-RPMI 1640 培养液悬浮细胞，计数细胞，并调细胞浓度为 1×10 ml。

3. 孵育 取效应细胞和靶细胞各 0.1ml(E：T 100：1)加入细胞培养板中，设 3 个复孔，同时设靶细胞自然释放孔(0.1ml 靶细胞＋0.1ml 10% FCS-RPMI 1640 培养液)和最大释放孔(0.1ml 靶细胞＋0.1ml 1% NP40 液)，1000r min，离心 10min。置 37℃，5% CO_2 孵育 2h。1000r min，离心 5min。如表 5-1。

表 5-1 孵育过程

	靶细胞	效应细胞	10% FCS-RMPI 1640 培养液	NP 40
效应细胞酶自然释放孔		100μl	100μl	
靶细胞酶自然释放孔	100μl		100μl	
靶细胞酶最大释放孔	100μl		-	100μl
杀伤检测孔	100μl	100μl		
空白对照孔			200μl	

4. 测定 吸取各孔上清 0.1ml 加至新 96 孔板中，37℃，10min。每孔再加入 0.1ml 新配制的 LDH 底物溶液，室温避光反应 10～15min。加入 30μl 1mol L 枸橼酸终止液终止酶促反应。用酶标仪在 570nm 波长下读各孔 A 值。

（五）结果分析与正常值

NK 细胞活性(%)＝(实验组 A 值－效应细胞自然释放组 A 值)÷(靶细胞最大释放对照组 A 值－靶细胞自然释放对照组 A 值)×100%

正常值：(25±5)%。

（六）注意事项

1. 取不同细胞应更换移液头。
2. YAC-1 细胞使用前需要用 RPMI 1640 洗涤。
3. 比色孔内如有气泡应将其去除，否则影响比色结果。
4. 无论采用何种试验方法，靶细胞的质量是影响细胞标记率、自然释放率及实验稳定性重要的因素。一般要求靶细胞的自然释放率＜10%。
5. 吸取细胞培养上清时，应尽可能不吸动沉淀的细胞。

第三节 超敏反应检测方法

一、皮肤超敏反应测定

皮肤超敏反应主要检测Ⅳ型超敏反应。国外最常用的方法是 Buehler 试验(BA)和豚鼠最大值试验(GPMT)。前者是不加佐剂的局部封闭涂皮法，后者是加福氏完全佐剂的皮内注射加涂皮法。目前国内现有毒理学试验规范中采用的豚鼠皮肤超敏反应与这两种方法略有不同，具体可参照有关规范。

二、呼吸道超敏反应测定

(一) 实验目的

观察实验动物经呼吸道反复接触外源化学物后，出现呼吸道和全身超敏反应情况，评价待测化学物有无致敏性。

(二) 基本原理

呼吸道超敏反应试验主要检测Ⅰ型超敏反应。外源化学物作为致敏原，进入机体后刺激免疫系统产生致敏的淋巴细胞或抗体，持续间歇致敏，末次给药后第10天经呼吸道激发，使机体产生超敏反应。

(三) 试验材料

1. 实验动物　成年健康白色豚鼠，体重250～300g。
2. 器材　电子天平或动物秤、4L密闭玻罩、400mmHg恒压喷入装置。
3. 阳性致敏物　卵蛋白原液及配成5%的喷入激发浓度。
4. 待测化学物　可由带教老师自定。

(四) 实验步骤

1. 动物分组　按豚鼠体重、性别随机分成3组，分别为待测物组、空白对照组(赋形剂组)和阳性对照组(给阳性致敏物)。每组10只。

2. 致敏　取待测物0.5ml腹腔注射，隔日1次，共5次。空白对照组和阳性对照组分别注射赋形剂或卵蛋白，方法同上。

3. 激发　末次致敏后第10天，将致敏豚鼠置于4 L密闭玻罩内，用恒压(400mmHg)喷入5%卵蛋白溶液60 s，观察豚鼠是否发生呼吸困难、咳嗽，甚至休克跌倒等现象。空白对照组和阳性对照组方法同上。

(五) 结果判断与评价

试验结果按呼吸道超敏反应评分(表5-2)判断。

表5-2　呼吸道超敏反应评级

呼吸道反应	级别
呼吸困难	1
呼吸困难和咳嗽	2
呼吸困难、咳嗽和休克	3

三、腘窝淋巴结试验

(一) 实验目的

掌握外源化学物引起小鼠腘窝淋巴结增殖反应的方法。

(二) 基本原理

将可引起超敏反应或自身免疫反应的化学物注射在小鼠足跖部皮下，可引起腘窝淋巴结内T、B细胞增殖而使淋巴结肿大，重量增加和细胞数改变。试验方法有直接法、间接法和过继转移法，本实验采用直接法。

（三）试剂与材料

1. 小鼠，6～8周龄，体重18～22g。

2. 受试物，由代教老师决定。

3. 微量注射器、24孔培养板、血细胞记数板、天平（感量为0.01mg）、显微镜。

（四）操作步骤

1. 将待测样品配制成适当浓度（一般<10mg/kg，不至于产生细胞毒作用），于小鼠右侧后肢足趾部从足跟向足尖方向皮下注射10μl，同时左后肢足趾部皮下注射10μl溶剂作为对照。

2. 7天后，颈椎脱臼处死小鼠，分别取其双侧后肢腘窝淋巴结，去除周围结缔组织及脂肪，称重。

3. 将腘窝淋巴结放在盛有1ml/孔生理盐水的24孔板内，制成单个细胞悬液，记数细胞数。

（五）结果与评价

观察终点为腘窝淋巴（PLN）重量指数及PLN细胞指数：

PLN重量指数=实验侧PLN重量/对照侧PLN重量。

PLN细胞指数=实验侧PLN细胞数/对照侧PLN细胞数。

（六）注意事项

1. 实验中所用受试物浓度应通过预试验来确定，受试物浓度过高、过低均可引起假阴性结果。

2. 由于受试物不同，最大反应时间不一定都在第7天，可根据具体情况提前或者延后。

3. 剥离PLN周围组织时一定要彻底，分离后立即称重，否则会影响称重结果。

（朱心强）

第六章

生殖毒理学研究方法

第一节　生殖毒性试验

随着社会经济的发展，人类接触的外源化学物如农药、医药、食品添加剂以及环境中存在的各种污染物日益增多，其中许多物质反复接触后可损伤生殖细胞或胚胎细胞，引起生殖能力下降、不孕不育、胚胎死亡、畸形和遗传疾病等多种严重后果。生殖毒性试验的研究，为评价生殖毒物对亲代和子代生殖和发育的影响提供了检测方法和手段。

一、一代生殖毒性试验

（一）目的

观察受试毒物或药物对生殖全过程的影响。

（二）原理

为研究受试物的生殖毒性作用，亲代（P）雄性动物精子形成期，雌性动物卵泡发育期、交配期、妊娠期和授乳期直接接触受试物，子代（F_1）在母体子宫内和经哺乳间接接触受试物。雄鼠5～8周龄后给予受试物至交配期止，共8～10周，可反映其经血睾屏障后对生殖细胞的毒性作用。雌鼠卵细胞发育过程需4～5天，至少给药3个性周期才能使其作用于整个交配期所排出的卵子，因此，性成熟的亲代（P）雌性动物交配前2周开始给予受试物至授乳期止。

（三）试剂与器材

1. 试剂

（1）透明液：透明液A：甘油20ml，蒸馏水77ml，2%KOH 3ml；透明液B：甘油50ml，蒸馏水47ml，2%KOH 3ml；透明液C：甘油75ml蒸馏水25ml。

（2）阿利新蓝乙醇溶液：阿利新蓝100mg，70%乙醇1000ml，冰醋酸50ml。

（3）茜素红贮备液：冰乙酸5ml，甘油10ml，1%水合氯醛60ml配成混合液，取适量茜素红边加边搅拌，直至饱和为止。

（4）茜素红应用液：取茜素红贮备液1ml加人1%KOH至1000ml。

（5）Bouin固定液：苦味酸饱和液75ml，甲醛20ml，冰乙酸5ml。

2. 器材　生物显微镜，解剖显微镜，注射器，放大镜，游标卡尺，玻璃标本瓶，镊子，剪刀，恒温水浴箱，平皿，吸管和棉签等。

（四）操作步骤

1. 动物选择　啮齿类动物首选大鼠，小鼠也可，非啮齿类动物选家兔。雄鼠5～8周龄，体重约80～100g，性成熟雌鼠体重180～200g。

2. 剂量与分组　设四组，即对照组和一个给药组．高剂量组应选择有轻度毒性的剂量，如体重减轻、摄食量减少、特异靶器官毒性等；低剂量组选无毒性作用剂量；中间剂量组介于高低剂量之间。每组、每性别动物数20只。

3. 染毒方法　染毒途径应与人的实际接触途径相同。雄鼠染毒6～8周时，雌鼠开始染毒，持续2周后，雌雄大鼠按1∶1同笼交配，交配时间为2周，每日晨检查雌鼠阴道中有无精子，主要方法有：阴栓检查法和阴道涂片镜检法。雄鼠染毒至雌鼠受孕成功后处死，性腺组织和器官进行组织病理学检查；部分孕鼠在分娩前一天处死，检查胎鼠形态与结构的异常，其余染毒至子代断乳处死。

4. 观察指标

(1)一般状态的观察：实验期每天观察受试动物活动、步态、行为及对外界的反应情况等，每周称体重一次，并记录摄食量以及交配行为、受孕率等。

(2)雄性观察指标：垂体、睾丸、附睾、副性腺、前列腺重量及病理，性激素水平，精子数量及质量（包括形态、运动能力等），性行为，其他（睾丸下降、包皮分离、精子生成、肛门生殖器间距、外生殖器的结构等）。

(3)雌性观察指标：子宫、卵巢、阴道重量及病理、动情周期，卵巢原始卵泡数量等。

(4)受孕后观察指标：子宫大小、胚胎植入数目、胎仔数目、活胎数目、死胎数目、畸形发生率等。

(5)出生后观察指标：亲代雌鼠分娩、哺育、哺乳等情况、子代体重和身长及其生长、发育、出生胎、存活胎、死胎、畸形率、分娩后21天存活率及其功能检测等。

(五) 结果分析与评价

综合亲代(P)和子代(F_1)各项观察指标，对受试物生殖毒性作出评价，评价指标主要有：

$$\text{交配指数}=\frac{\text{阴道检出精子的雌鼠数}}{\text{用于交配的雌鼠数}}\times 100$$

$$\text{生育指数}=\frac{\text{与雄鼠交配受孕的雌鼠数}}{\text{与雄鼠同笼的雌鼠数}}\times 100$$

$$\text{妊娠(受孕)指数}=\frac{\text{正常分娩雌鼠数}}{\text{妊娠的雌鼠数}}\times 100$$

$$\text{活产指数}=\frac{\text{活产胎仔数}}{\text{胎仔总数}}\times 100$$

$$\text{性别比}=\frac{\text{雄性胎仔数}}{\text{雌性胎仔数}}\times 100$$

$$\text{4天存活指数(生存力指数)}=\frac{\text{哺乳4天存活仔鼠数}}{\text{活产胎仔总数}}\times 100$$

$$\text{哺乳指数(断乳指数)}=\frac{\text{出生21天存活仔鼠数}}{\text{活产胎仔总数}}\times 100$$

(六) 注意事项

1. 剂量选择　剂量较大，易导致不孕而无法检查生殖毒性，剂量过小，不能产生相应的生殖毒性，因此，剂量选择最好进行预试验。

2. 受孕检查　雌鼠阴道检查使用的棉签、吸管、生理盐水均应无菌，以免人为原因导致不孕。

3. 胎仔检查　解剖母鼠取胎仔以及胎仔内脏、骨髓检查等应细心，避免因人为损伤而影响结果判断；胎仔应全部浸入固定液中，并保持约一周以上的固定时间，染色液不宜着色过深；胎仔骨骼检查应避免遗漏，特别是枕骨、胸骨、肋骨和脊椎骨的变化。

二、两代(多代)生殖毒性试验

(一) 目的

观察受试毒物或药物对亲代(P)生殖全过程和子代(F_1)整个生长、发育及生殖过程的影响。

(二) 原理

为研究受试物在整个生命周期中对生殖和发育的毒性作用，亲代(P)雄性动物5～8周龄后给予受试物至交配期止，共8～10周，亲代(P)雌性动物交配前2周开始给予受试物至授乳期结束。子一代(F_1)动物断乳后给予受试物，雄鼠至交配完成止，雌鼠历经交配期、妊娠期、授乳期。子二代(F_2)在子一代(F_1)母体子宫内和哺乳期间接接触受试物，两代以上生殖毒性试验方法依此类推。

(三) 试剂与器材

同一代生殖毒性实验。

(四) 操作步骤

1. 动物选择　同一代生殖毒性实验。

2. 剂量与分组　同一代生殖毒性实验。子一代(F_1)断乳后染毒剂量与P相同，其中雄鼠持续染毒至与雌鼠交配成功，雌鼠染毒至F_2断乳为止。

3. 染毒方法　染毒途径应与人的实际接触途径相同。亲代(P)鼠接触受试物方法同一代生殖毒性实验，即雄鼠给予染毒8～10周，雌鼠2周后，进行交配，部分孕鼠分娩前一天处死，检查胎鼠形态与结构的异常，其余染毒至子代断乳处死。子一代(F_1)断奶后开始持续给予受物，直至性成熟开始交配、受孕和哺乳期，以保证子二代(F_2)通过胎盘和乳汁接触受试物。

4. 观察指标　同一代生殖毒性实验，对P、F_1和F_2代的各项指标分别进行观察与计算

(五) 结果分析与评价

两代生殖毒性实验子代(F_1)从母体子宫直至出生后生长、发育和生殖期连续染毒，符合人类生活中长期低剂量接触有害物质的特点，弥补了一代生殖毒性试验未能观察受试物对子代生殖与发育影响的不足，可用于检测对生殖系统具有间接或直接毒性作用的物质。

(六) 注意事项

1. 查明不育的原因　当动物染毒后出现不育时，应进行交叉交配，即未染毒雄鼠与染毒雌鼠交配，反之亦然，以明确不育动物性别，并进行相应的组织病理学检查、激素测定等，确立毒效应种类。

2. 影响子代发育的因素　仔鼠出生后其存活率以及生长、发育受母鼠饲养情况、宫

内开始的效应、乳汁的分泌量及其是否含有毒物等多种因素的影响，如出现死亡，死鼠应进行组织病理学检查；出现体重降低时，应进行交叉抚养，即染毒母鼠所产的仔鼠由未染毒母鼠抚养，或反之，以查明影响发育的病因。

3. 其他注意事项同一代生殖毒性实验。

第二节　环境雌激素检测

检测和甄别环境内分泌干扰物(EEDs)的生物学活性是深入研究EEDs生殖内分泌毒性的基础。1996年，美国EPA成立了内分泌干扰物筛选和测试咨询委员会(EDSTAC)，主要任务是制定筛选和检测EEDs的方法。EEDs的检测方法主要包括体外法(in vitro)和体内法(in vivo)两大类。EDSTAC建议将两类方法相结合，全面评价外源化学物的内分泌干扰作用。由于目前对环境雌激素(EEs)的研究较多也最为详细，因此本节以EEs为例，扼要介绍目前最常用的几种检测方法。

一、大鼠子宫增重试验

(一) 目的

通过本次试验，学习和掌握大鼠子宫增重试验中的观察指标。

(二) 原理

子宫是雌激素重要的效应器官，具有雌激素活性的外源化学物可导致未成熟雌性大鼠和去除卵巢的成年雌性大鼠的子宫湿重明显增加。为此可选用未成熟雌性大鼠或去除卵巢的成年大鼠，受试物染毒1～3天后，以子宫湿重的脏器系数为指标，根据受试物是否具有促进子宫生长的作用来评价其雌激素活性。

(三) 试剂与器材

1. 健康成年雌性大鼠若干只。

2. 受试化合物(由指导老师自定)、苦味酸酒精饱和液、0.2%戊巴比妥钠溶液、黄体生成素(LH)和卵泡刺激素(FSH)放射免疫试剂盒等。

3. 注射器、动物体重秤、手术剪、眼科镊和液闪仪等。

(四) 操作步骤

1. 大鼠经戊巴比妥钠(45mg/kg bw)麻醉后，切除卵巢，术后饲养2～3周后进行试验。

2. 大鼠称重、编号，按体重随机分为3组，每组动物数量为10只，设空白对照组、受试物组和阳性对照组，分别皮下注射溶剂、受试物和雌二醇(1.0μg/rat)。

3. 在背部进行皮下注射染毒，连续3天。最后一次染毒后24h，大鼠精确称重并记录后经戊巴比妥钠（45mg/kg bw）麻醉，断头取血约5ml。剪开腹部，分离子宫，称重并记录。子宫转移到滤纸上，切开，释放出子宫内液，轻轻将子宫吸干，精确称重并记录。

4. 采集的血样室温下放置10min，血凝块形成后，4000r/min，离心10min，取上清，按试剂盒说明，采用放射免疫法测定血清中的LH和FSH。

(五) 结果分析与评价

1. 计算子宫内液流出前后子宫湿重的脏器系数，应用方差分析对三组总体均数的差异进行假设检验，如果受试物组脏器系数与空白对照组比较显著升高（$p<0.05$），可认为受试物具有雌激素活性。

2. 成年雌性大鼠在卵巢切除的情况下，体内雌激素为零，通过负反馈机制，刺激下丘脑合成和释放促性腺激素释放激素（GnRH），作用于垂体前叶导致 FSH 和 LH 的释放，血清 FSH 和 LH 含量增加。如果受试物具有雌激素活性，由于负反馈机制，血清 FSH 和 LH 含量降低。应用方差分析对三组血清 FSH 和 LH 浓度总体均数的差异进行假设检验，如果受试物组血清激素浓度与空白对照组比较显著降低（$P<0.05$），可认为受试物具有雌激素活性。

（六）注意事项

1. 为消除内源性雌激素的影响，切除卵巢后，至少要间隔 2 周才可进行试验。

2. 分离子宫时要小心，避免子宫内液流出。

二、雌激素受体结合试验

（一）目的

学习和掌握大鼠雌激素受体（ER）制备的方法，在此基础上，应用活性炭-葡聚糖（DCC）法进行 ER 竞争结合试验。

（二）原理

外源化学物竞争性地与 ER 结合是大多数环境雌激素发挥（抗）雌激素效应的前提，研究表明受体亲和力与激素活性间存在明显相关性，因此可根据环境雌激素与 ER 的特异性亲和力来检测其活性大小。

选取 ER 阳性的组织或细胞制备含 ER 的细胞提取液，加入 ^3H-E_2 和受试物共孵育，受试物与 ^3H-E_2 竞争结合 ER 位点。数小时后应用 DCC 去除游离的 ^3H-E_2，采用液闪计数法检测结合的 ^3H-E_2。外源性激素与 ER 的亲和力与检测到的 ^3H-E_2 量呈反向关系。

（三）试剂与器材

1. 健康成年雌性 SD 大鼠若干只。

2. 受试化合物（由指导老师自定）。

3. ^3H 雌二醇（^3H-E_2）。

4. 抽提缓冲液　Tris 121.1mg，EDTA 29.2mg，二硫代苏糖醇（DTT）30.9mg，甘油 10.0ml，高钼酸钠（Na_2MoO_4）241.9mg，苯甲基磺酰氟（PMSF）17.4mg，蒸馏水依次溶解后，用盐酸调 pH 至 7.5，定容至 100ml。

5. 洗脱缓冲液　Tris 121.1mg，磷酸二氢钠（$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$）156.0mg，Triton-X 100 0.1ml，蒸馏水溶解后，用盐酸调 pH 至 7.2，定容至 100ml。

6. TE 缓冲液　Tris 24.2mg，EDTA 5.8mg，蒸馏水依次溶解后，用盐酸调 pH 至 7.4，定容至 100ml。

7. 活性炭-葡聚糖悬液　2.5g 葡聚糖溶于 TE 缓冲液中，加入 25g 活性炭，振荡过夜，4℃保存。

8. 闪烁液　双苯恶唑（PPO）400.0mg，对次苯基苯恶唑（POPOP）40.0mg，Triton-X 100 33.3ml，甲苯 67.7ml，混匀。

9. 手术剪、眼科镊、液氮罐、匀浆器、低温高速离心机、离心管、分光光度计和液闪仪等。

(四) 操作步骤

1. 雌激素受体制备

(1)颈椎脱臼处死大鼠,剪开腹腔,分离并摘取子宫,滤纸吸干子宫内液体,置于液氮中保存。

(2)取出子宫组织,称重,剪碎后以1∶6(w/v)的比例加入预冷的抽提缓冲液。

(3)在冰浴条件下,用匀浆机匀浆,每次持续5s,间隔10s,重复6次。用玻璃匀浆器手动碾磨,直至溶液呈乳白色。

(4) 105,000g/min,4℃,离心60min。收集上清液,-80℃保存备用。

2. 体外竞争结合试验　总结合管(TB)中加入100μl受体制备液和终浓度为1nmol/L的^{3}H-E$_2$,竞争结合管中加入100μl受体制备液、终浓度为1nmol/L的^{3}H-E$_2$和不同终浓度的受试物(1pmol/L－1mmol/L),相应的非特异性结合管中(NSB)中,还需加入100倍^{3}H-E$_2$浓度的己烯雌酚(DES)。用抽提缓冲液定容至200μl,4℃孵育过夜。加入DCC 200μl,混匀。4℃静置10min后混匀10秒,如此重复3次。800g/min,4℃,离心5min。将上清全部倒入5ml闪烁液中,用液闪仪计数每分钟衰变数(dpm)。

(五) 结果分析与评价

1. 判断受试物与ER的亲和力可以用半数抑制浓度(IC_{50})来表示。IC_{50}是指抑制50%特异结合时受试物浓度。IC_{50}越小,表示受试物与ER的亲和力越大。

受试物的特异结合率(I%)计算公式如下:

$$I=\frac{竞争结合管\ dpm-非特异性结合管\ dpm}{总结合管\ dpm-非特异性结合管\ dpm}\times 100\%$$

以受试物浓度的对数log[I]为横轴,特异结合率为纵轴作图,求得IC_{50}。

2. 另外一种评价方法是作图法,以受试物浓度为横轴,特异结合率为纵轴作图,直观地反映受试物与ER的亲和力。如果特异结合率随受试物浓度的增加而减小,表明受试物可使ER结合的^{3}H-E$_2$减少。提示受试物与^{3}H-E$_2$竞争结合ER位点,具有与ER结合的能力。

(六) 注意事项

1. 由于ER对温度较敏感,整个试验过程应保持低温,匀浆前匀浆机转头预冷。

2. 结合试验中^{3}H-E$_2$的加入量最好能通过预试验,应用多点饱和试验确定。

3. 受体结合试验主要判断受试物与ER的结合能力,不能阐明结合后引起的生物学效应。因此确定受试物是否具有(抗)雌激素效应需结合其他试验。

三、MCF-7细胞增殖试验

(一) 目的

通过本次试验,学习细胞培养技术,并应用MCF-7细胞增殖试验检测外源化学物的雌激素活性。

(二) 原理

外源化学物可以作用于ER阳性、对雌激素敏感的细胞株,刺激细胞的分裂增殖,表

现为(抗)雌激素效应。根据这一原理,可选用ER阳性的乳腺癌细胞MCF-7与受试物共同孵育,应用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测细胞的生长变化。MTT可被活细胞内的琥珀酸脱氢酶还原成不溶于水的蓝紫色甲臜结晶,溶于二甲基亚砜后,对吸光度值进行测定,由于结晶物的形成量与细胞数量成正比,因此吸光度值可反映外源化学物刺激细胞生长的情况。

(三) 试剂与器材

1. 受试化合物(由指导老师自定)。

2. MCF-7细胞株。

3. 含酚红和不含酚红的RPMI1640培养基(含10%胎牛血清)。

4. 0.25%胰酶-0.02%EDTA消化液 称取胰蛋白酶250mg和EDTA-Na_2 20mg,依次溶解于高压消毒的D-Hanks液(pH 7.2),室温下搅拌振荡4h,定容至100ml,分装,-20℃保存。

5. MTT 用PBS配制成5mg/ml,用微孔滤膜滤过消毒备用。

6. 二甲基亚砜(DMSO)。

7. 超净工作台、CO_2培养箱、倒置相差显微镜、低温高速离心机、滤器和酶标仪等。

(四) 操作步骤

1. 37℃、5%CO_2条件下,用含酚红的RPMI1640培养基培养MCF-7细胞。当细胞生长至80%满瓶时,加入消化液消化。用不含酚红的RPMI1640培养基将细胞浓度调整为10^4/ml,接种于96孔培养板上,每孔100μl。

2. 细胞培养24h后,弃培养基,加入不同浓度受试物、乙醇和雌二醇的不含酚红的RPMI1640培养基,分别作为染毒组、溶剂对照和阳性对照组,每组均设6个复孔。

3. 每2天换一次液,培养6天后弃上清。每孔加入MTT 25μl,继续培养4h。弃上清,加入DMSO150μl/孔,振荡10min。酶标仪检测吸光度值(490nm)。

(五) 结果分析与评价

1. 应用方差分析和q检验对各组OD值总体均数的差异进行假设检验,比较各组差异。若染毒组OD值显著高于溶剂对照组($P<0.05$),可认为受试物引起MCF-7细胞的增殖,表现为雌激素效应;若染毒组OD值显著低于溶剂对照组($P<0.05$),可认为受试物抑制MCF-7细胞的增殖,表现为抗雌激素效应;若染毒组OD值与对照组比较差异无显著性($P>0.05$),可认为受试物不影响MCF-7细胞的增殖,不表现为(抗)雌激素效应。

2. 计算阳性对照组和染毒组相对于溶剂对照组的增殖倍数,公式为:

$$增殖倍数=\frac{阳性对照组或染毒组\ OD}{溶剂对照组\ OD}$$

(六) 注意事项

由于pH指示剂酚红具有较明显的雌激素活性,因此在试验过程中应使用不含酚红的培养基。

第三节 精子动力学研究

(一) 目的

学习运用计算机辅助精子分析(CASA)系统评价精子的运动状况,了解精子的运动特征。

(二) 原理

精子的运动包括两方面的重要内容,即精子的运动活力和运动方式。精子的运动活力主要反映精子头(体)部作为一个"刚体"物质的运动轨迹速度,而精子的运动方式主要表现在精子鞭毛的摆动形式,及由此产生的精子直线和非直线运动。本实验运用自动化的数字图像分析系统对精子运动的视频信号进行数字化处理和分析,评价精子的运动特征。

(三) 试剂与器材

1. 试剂 大鼠精子培养液:M199 培养基 9.5g,$NaHCO_3$ 2.4g,HEPES 4.76g,溶于1000ml 双蒸水,用滤菌器抽滤除菌,分装,-20℃ 保存。临用前加 0.1% 小牛血清清蛋白,调整 pH 为 7.6。

2. 器材 CASA 仪,英国 Hobson Track 公司生产,分析软件为 HST 7VIB,配置日本尼康 LABOPHOTO-2 型相差显微镜,澳大利亚 LEC916 型电热镜台,日本索尼 CCD-IRIS 黑白显微摄像机及日本索尼 SLV 447 型录像机。恒温培养箱、水浴箱、血细胞计数板或 μ cell 板和恒温离心机等

(四) 操作步骤

1. 附睾精子收集 参照 Klinefelter 等建立的方法,采用扩散法从附睾尾部收集精子,具体操作简述如下:将 3mlM199 置于直径 35mm 的培养皿中于 37℃ 预温,分离双侧附睾尾,迅速转移到上述培养皿中,用手术剪刀剔除附睾尾上附着的脂肪组织,静置 1~2min,将附睾尾转移到另外一个含 3mlM199 的培养皿中。用手术刀沿附睾尾纵向作 4~5 个深切口,将此培养皿置 37℃ 恒温培养箱中扩散 5min,去掉残余的附睾组织,精子悬液保存在 37℃ 恒温培养箱中备用。

2. 精子运动能力检测 将精子悬液轻轻混匀,吸取约 60μl 加入到 37℃ 预温的 3ml M199 中,调整精子浓度为$(6.0\pm2.0)\times10^6$ 精子/ml。吸取稀释后的精子悬液 7~10μl 至预温的血细胞计数板样品槽中(深度 100μm),将血细胞计数板置于 37℃ 的显微镜载物台上,显微镜采用×4 反相物镜,用显微摄像机和录像机记录精子运动图像。每份样品分析 200 个轨迹,约记录 10~15 个视野,每个视野 10~15s。CASA 仪设定的主要参数为:搜索半径 28.88μm,踪迹 59,阈值+18/100,轨迹间隙时间 0.8s,取样间隔时间 2s,非活动精子判断方式:手动。

3. 各项分析参数的意义 精子轨迹分析参照 Holt 等介绍的分析参数,主要包括:直线运动速度(VSL,μm/s),曲线运动速度(VCL,μm/s),平均路径速度(VAP,μm/s),精子头侧摆幅度(ALH,μm),直线性(LIN,%),前向性(STR,%),鞭打频率(BCF,Hz),活动精子比率(MOT,%)。其中,VSL、VCL、VAP 和 BCF 是表示精子运动活力的参数,LIN、STR 和 ALH 是表示精子运动方式的参数。

(五) 结果分析与评价

将 CASA 仪记录的结果转入 SPSS 统计软件包中。根据研究设计,比较外源化学物不同剂量、不同时间对精子运动能力和运动方式的影响,评价该化学物的雄性生殖毒性。

(六) 注意事项

1. 培养基 M199 的配制，尤其是 pH 的调整，应尽可能精确些，因为 pH 对精子的运动及存活的影响很大。

2. 温度也是影响 CASA 分析的重要因素，除了恒温加热台和恒温箱的保温外，室温的影响不可忽视。所以，在 CASA 分析室内，须保持 25℃～30℃，才能保证在分析时间精子的运动不受外界因素的干扰。

3. 计数板的深度要适宜，最好采用进口的血细胞计数板或 μ cell 板。

4. 仪器的设定参数随不同种属的精子而变，评价人的精子和大鼠的精子，其参数值是不同的。

5. 收集精子的过程中，手术刀切割的动作要轻、简洁，以免人为伤害精子；此外，残余组织清洗要干净。

第四节　性激素水平分析

一、血清、睾丸/卵巢组织匀浆液中 FSH 含量测定

（一）目的

以 FSH 为例，初步掌握用放射免疫法（RIA）检测性激素水平的方法，并根据参考值，评价机体生殖内分泌状况，或评价环境化学物对生殖内分泌功能的影响。

（二）原理

以天津九鼎医学生物工程有限公司试剂盒为例，采用双抗体放射免疫法。

含待测激素的样品、^{125}I 标记的待测激素（或其衍生物）标准品与抗体竞争形成抗原抗体复合物：



$$Ag + Ag^{*} + Ab \rightleftharpoons [Ag^{*}Ab] + [AgAb]$$

在抗原抗体反应达到平衡后，加入驴抗兔抗体及 PEG，使游离部分和结合部分分离。



$$[AgAb_1] + [Ag^{*}Ab_1] + Ab_2 \rightarrow [AgAb_1]Ab_2\downarrow + [Ag^{*}Ab_1]Ab_2\downarrow$$

离心后，用 γ 计数器测量沉淀部分的放射性强度（cpm）。$[Ag^{*}Ab_1]Ab_2$ 复合物的形成将随着 Ag 的增加而减少，通过测定 $[Ag^{*}Ab_1]Ab_2$ 就能从标准曲线上查得未标记抗原的量。

（三）样品的制备

1. 血清制备　血样采集后，离心，3500r/min，20min 静置片刻，吸取上清液，－20℃保存。

2. 睾丸（卵巢）组织制备　取一定重量的睾丸（卵巢），去被膜，称重，剪碎，以 1∶4（g/ml）比例加入生理盐水，用玻璃匀浆器制成匀浆液，用低温高速离心机 10000r/min，30min 静置片刻，取上清液，－20℃保存。

（四）试剂与器材

1. ^{125}I-FSH 溶液　含放射性强度＜103.7×10 Bq 的 ^{125}I 标记的 FSH 和磷酸盐缓冲液，2℃～8℃保存。

2. FSH 抗体　含兔抗人 FSH 的抗血清及磷酸盐缓冲液，2℃～8℃保存。

3. FSH 标准 7 瓶，浓度分别为 0、2.5、5、10、20、40、100 IU L 的 FSH 血清，2℃～8℃保存。

4. 质控血清 2 瓶，含正常水平及高浓度 FSH 的人血清，2℃～8℃保存。

5. PEG 第二抗体 含 PEG 及驴抗兔抗血清，2℃～8℃保存。

6. 器材 塑料试管、可调微量加样器、匀浆器、离心机、水浴锅、γ 计数器。

（五）操作步骤

先在塑料管上编号，然后按表 6-1 所列程序进行操作。

（六）结果分析与评价

1. 结果计算 以各标准管 B B_0% 为纵轴，标准物浓度（IU L）为横轴，在坐标纸上绘制标准曲线。在标准曲线上查出各标本的 FSH 浓度。

2. 结果评价 正常值：男性成人 3～13 IU L，女性绝经期后 20～312 IU L；月经周期滤泡期 5～21 IU L，排卵期 12～30 IU L，黄体期 6～15 IU L。

表 6-1 FSH 测定操作程序

	NSB	T	标准曲线	QC	标本
标本或标准(ml)	0.2(0 标准)		0.2	0.2	0.2
抗血清(ml)	0.2(H_2O)		0.2	0.2	0.2
^{125}I FSH(ml)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
	充分混匀，在室温下过夜(12～16h)				
沉淀抗体(ml)	0.5		0.5	0.5	0.5

充分混匀后，3000r min 离心 20min，弃上清液，用 γ 计数器测定沉淀物的放射强度。

（七）注意事项

1. 血清分离过程中避免溶血，严重溶血的标本不能用；组织匀浆要彻底。

2. 按试剂盒提供的步骤进行试验，最好在正式试验前进行预实验，以确定合适的取样量。

3. 血清在 2℃～8℃保存不能超过 48h，否则应放 20℃保存，避免反复冻融。

4. 若待测标本 FSH 浓度超过 100 IU L，则应用 0 标准稀释后重测。

5. 弃上清液注意不得损失沉淀物，否则会明显影响测定结果。

6. 由于血清中 FSH 呈脉冲式分泌，故变化较大，用一次测定值解释结果时，应慎重。

7. 雌激素治疗和某些药物、生物物质可以影响 FSH 的测定结果。

8. 妊娠时高 hCG 水平可以影响 FSH 测定结果。

二、尿液中 FSH 含量测定

（一）目的

以 FSH 为例，学习用酶免疫分析法（ELISA）测定尿液中 FSH，结合血清或组织匀浆中 FSH 的分析结果，综合评价其生殖内分泌状况。

（二）原理

本方法属于酶免疫分析法中的双抗体夹心法，将一抗（抗 FSHβ 亚单位的单克隆抗

体)包被在固相载体上,加入含有 FSHβ 亚单位的尿样或系列标准,使 FSHβ 亚单位与包被抗体结合;加入二抗(兔抗 FSHβ 亚单位的抗血清),使二抗与 FSHβ 亚单位结合,形成一抗 FSHβ 亚单位-二抗复合物;加入三抗(生物素标记的羊抗兔抗体),使三抗与二抗结合,形成一抗 FSHβ 亚单位-二抗-三抗复合物;再加入 APS(链亲和素连结的酸性磷酸酶),通过酶促反应,测定结合上的 FSHβ 亚单位量。

(三) 试剂与器材

1. 单克隆抗 β-hFSH(FS2 4A10-G10),兔抗 β-hFSH 抗血清,生物素标记多克隆羊抗兔 IgG,FSHβ 亚单位标准品,完整 FSH(intact FSH)标准品(DPC RIA),p-对硝基酚磷酸(pNPP)。

2. 包被缓冲液　Na_2CO_3 16.9g,加入 H_2O 900ml,调节 pH 值至 9.6,加水补足 1000ml,4℃下保存。

3. 酪蛋白阻断剂　$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 1.38g,NaCl 9.0g,加入 900ml H_2O,调节 pH 值至 7.5,加入 Tween-20 0.5ml,10g 酪蛋白,搅拌使之彻底溶解,加水补足 1000ml,4℃下保存。

4. 缓冲液 B　$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 1.38g,NaCl 9.0g,EDTA 3.8g,Tween-20 0.5ml,加入 900ml H_2O,调节 pH 至 7.5,加水补足 1000ml。4℃下保存。

5. 样本缓冲液　$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 69g,NaCl 9.0g,BSA 10g,叠氮钠 500mg,加入 900ml H_2O,调节 pH 至 7.5,加水补足 1000ml。室温下保存。

6. 标准稀释液　$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 6.9g,NaCl 9.0g,BSA 10g,叠氮钠 500mg,加入 900ml H_2O,调节 pH 至 7.35,加水补足 1000ml。4℃下保存。

7. APS 缓冲液　Tris 碱 1.21g,NaCl 58g,加入 900ml H_2O,调节 pH 至 7.5,加入 Tween-20 0.5ml,加水补足 1000ml。4℃下保存。

8. 底物缓冲液　二乙醇胺 105g,加入 900ml H_2O,调节 pH 至 9.0,加入 1mol/L $MgCl_2$ 1ml,加水补足 1000ml。4℃下保存。

9. 洗液(10×)的配制　NaCl 88g,加入 900ml H_2O,搅拌使之溶解,加入 5ml Tween-20,加水补足 1000ml。室温下保存,用时作 1：10 倍稀释。

10. 器材　96 孔酶标板,12 孔微量可调加样器,尿样稀释仪,全自动酶标仪。

(四) 操作步骤

1. 尿样的采集　采集 1 次或连续多次的晨尿,-20℃保存,不加任何防腐保存剂;尿样在测定前在沸水中加热 2min,以使尿液中的 FSH 完全解离为 α、β 亚单位。

2. 包被　在酶标板各孔中加入 200μl 10μg/ml 的单克隆抗 βhFSH(用包被缓冲液稀释),室温下孵育 6h 或过夜。

3. 阻断　除去剩余液体,拍干,每孔加 250μl 阻断剂进行阻断。

4. 加样　除去阻断剂,洗板,样本缓冲液以 50μl/孔的量加入各孔。150μl 加热处理的尿样、倍比稀释(用标准稀释液作稀释)的 FSHβ 亚单位标准及内控分别加入相应各孔内,室温下孵育 6h 或过夜。

5. 加二抗　洗板后每孔加 200μl 1：10000 倍稀释(用缓冲液 B 进行稀释)的兔抗 β-hFSH 抗血清,室温下孵育 6h。

6. 加三抗　洗板,生物素标记的多克隆羊抗兔 IgG 以 1：6400 的比例稀释(用缓冲

液B进行稀释)后，每孔加200μl，室温下孵育2h。洗板后每孔加200μl 1：2000倍稀释(用APS缓冲液进行稀释)的碱性磷酸酶(APS)，室温孵育1h。

7. 显色 洗板4次，加入1mg/ml pNPP 200μl/孔(用底物缓冲液进行稀释)。上述各步，每次洗板后均需拍干。

8. 读数 应用全自动酶标仪，在双波长(420nm和620nm)下读板。

9. 尿肌酐的测定(碱性苦味酸法)：96孔板B行各孔加入100μl标准和内控，C-H行每孔加入50μl蒸馏水后再加入50μl 1：50倍稀释的尿样，然后各孔分别加入50μl 0.75mol/L NaOH及0.04mol/L苦味酸。应用自动酶标仪测定吸光度值(490nm和620nm)，测得肌酐浓度。

(五) 结果分析与评价

1. 结合尿液PdG结果，可以推断不同的月经周期类型(正常未孕周期，正常妊娠周期，卵泡期过长，不排卵，早期胎儿丢失)。

2. 尿液中的FSH可用以判断女性生殖功能低下的病因及发病部位。较低水平的FSH反映下丘脑或脑垂体的病变；卵泡早期相对低水平的FSH可能是卵泡期过长的原因，可能导致不排卵而成为不孕症的病因；整个周期持续高水平FSH，而不出现尿液PdG水平升高，可能提示卵巢功能不良，卵泡不能正常发育。在男性，血清中FSH的升高程度与支持细胞/生殖细胞连接受损程度成正比，受损愈严重，FSH上升愈高。血清FSH升高，局部T浓度下降，将直接影响精子的发生，导致少精。

(六) 注意事项

1. 尿样收集要根据研究需要，做到标准、规范、连续而不中断；标签要规范、清楚；尿样在收集以后到分析前，妥善保存，不可随意、多次解冻。

2. 所有与试验有关的耗材，要清洁无污染，最好使用一次性的试验耗材。

3. 洗板和敲板是本试验的重要一环，要十分熟练，做到干净、利索。

4. 结果分析时要慎重对待极个别短暂的异常值；此外，在判断早早孕丢失时，要力求准确、规范、有统一的标准，必要时须根据临床症状综合判断。

5. 有些药物可能会影响FSH的测定，如口服避孕药、促排卵药物等，因此，在正式确定尿样收集前，应了解有关情况，避免各种不良因素的影响。

三、尿液中β-hCG含量测定

(一) 目的

以人绒毛膜促性腺激素(β-hCG)为例，学习运用免疫放射法(IRMA)法测定尿液hCG的含量，并以该指标评价早期妊娠、早早孕丢失以及临床疾病状态，学会运用该指标评价外源性化学物对女性生殖内分泌功能的影响。

(二) 原理

hCG由α和β两个亚单位组成，其结合部分存在共同的B109结合位点，β亚单位存在B204和B108结合位点；在已用B109和B204包被好的酶标板孔中，加入含有β-hCG的样品，样品和B109及B204发生免疫反应，形成免疫复合物，再加入已被^{125}I标记的B108，形成免疫复合物，该复合物的量与样品中β-hCG的量成正比例，可通过γ-计数仪测定其放射强度而对样品进行定量。

（三）试剂与器材

1. 包被缓冲液　0.2mol/L $NaHCO_3$(16.8g/L)，pH9.5。

2. Tris 缓冲液(1mol/LTris，pH9.0)　1L 中含有 1.52g Trizma HCl 和 10.94g Trizma Base（约总 Tris Base 12.1g/L）。

3. BSA 缓冲液　1% BSA(10g/L)，0.1% NaN_3。

4. 缓冲液 B　0.01mol/L $NaHPO_4$，0.15mol/L NaCl，0.07mol/L EDTA，0.1% BGG，0.1%NaN_3，pH6.0，4℃冰箱保存，备用。

5. B109　hCGβ 亚单位结合单克隆抗体，也可以与 hCGα 亚单位结合，是测定结合型 β-hCG 的抗体。

6. B204　hCGβ 亚单位单克隆抗体，只能结合游离型 hCG 的 β 亚单位，是测定游离型 β-hCG 的抗体。

7. hCG 标准品。

8. ^{125}I B108。

9. 器材　12 孔微量可调加样器、标准 96 孔酶标板（Nunc 板）、全自动 γ-计数仪、全自动酶标仪。

（四）操作步骤

1. 尿样收集方法及保存　从不采取避孕措施的第一个月经周期开始，每天连续留取晨尿，密封、贴上标签（编号、留尿日期、周期及天序数），置冰箱 -20℃保存，直至临床确诊为怀孕为止；尿样集中后，按研究对象及留尿时间顺次排好，解冻后，分装于 12 联小塑料试管中，-20℃冷冻保存备用。

2. 包被　在包被缓冲液中加入 B109 和 B204，B109 和 B204 的工作浓度分别为 5μg/ml 和 10μg/ml，轻轻混匀后，放入 -20℃冰箱冷冻至少 18h，然后解冻，每孔加入 200μl，封板，4℃过夜或 37℃孵化 3h。

3. 去除未结合抗体，在纸巾上敲干；加入 250μl 或 300μl/孔的 BSA 缓冲液。室温孵化 3h 或 4℃过夜，最长可达 4 周。

4. 去除 BSA，用去离子水洗 3 次。

5. 样品准备（提前 1 天准备）　取 0.5ml 尿样于玻璃试管中，同时取标准和内控于玻璃试管中，加入 250μl Tris 缓冲液，混匀后静置过夜。

6. 在相应的试管内分别加入尿样、标准、内控 200μl/ml。室温孵化 14h 或 4℃可达 4 天。

7. 倾去板中液体，用去离子水洗板 6 次，加入 200μl/孔^{125}I B108。在缓冲液 B 中加入^{125}I-B108，使计数达 60000～100000cpm。封板后，室温或 4℃冰箱过夜（4℃冰箱最多可存放 4 天）。

8. 去除板中液体，洗板 6 次，将各孔拆开放入 12×75 的玻璃试管中，γ-计数器测定放射强度。

9. 用碱性苦味酸法测定每份尿样中尿肌酐的含量，作校正用。

（五）结果分析与评价

1. 所有尿样的 β-hCG 及相应尿肌酐含量均转入 EXCEL 软件中，计算经尿肌酐校正的 β-hCG 的值。

2. 以月经周期的天序数为横坐标，β hCG 的值为纵坐标作图。

3. 判断标准

(1)判断妊娠的标准：尿样中 β hCG 的含量升高超过基线的 3 倍以上，且随着时间的延长继续升高，并维持较高的水平不下降，至少持续 3 天以上，也可以结合临床综合判断。

(2)判断发生早早孕丢失(EFL)的标准：从来月经的第一天计算(假如月经周期为 30 天)，约第 18～24 天间，若发生 β-hCG 的含量上升并达到一般水平的 3 倍以上，且持续时间超过 3 天后再回落到一般水平，即可判断为发生 EFL 一次。(β hCG 含量变化的时间，可根据尿液中 FSH 或 PdG 所确定的排卵时间来定，也可根据测定基础体温来确定，一般在排卵后的第 4～10 天内，β-hCG 出现上述情况才可判为有效，否则非 EFL)。

(六) 注意事项

1. 尿样收集要根据研究需要，做到标准、规范、连续而不中断；标签要规范、清楚；尿样在收集以后到分析前，妥善保存，不可随意、多次解冻。

2. 所有与实验有关的耗材，要清洁无污染，最好使用一次性的实验耗材。

3. ^{125}I-B108 的放射性随时间而衰减，因此必须根据研究进度适时订购该标记物；此外，在测试过程中，^{125}I 的放射强度要足够(60000～100000cpm)，以保证足够的灵敏度。

4. 由于系 ^{125}I 具有放射性，在加样和仪器分析时，要做好自我防护；用完后的耗材，尤其是有放射性的小管，要按规定统一处理，以免污染环境。

5. 结果分析是本实验中十分重要的一个环节，尤其要慎重对待极个别短暂的异常值；此外，在判断早早孕丢失时，要力求准确、规范、有统一的标准，必要时须根据临床症状综合判断。

6. 有些药物可能会影响 hCG 的测定，如口服避孕药、hCG、促排卵药物等，因此，在正式确定尿样收集前，应了解有关情况，避免各种不良因素的影响。

(王心如)

第七章

神经毒理学研究方法

第一节　迟发性神经毒性试验

（一）目的

了解试验农药的迟发性神经毒性，求出迟发性神经毒性无作用剂量。

（二）原理

某些有机磷类和氨基甲酸酯类化合物，在引起动物或人类急性中毒恢复后8～14天，出现一种持久的神经毒作用。主要表现为运动性共济失调和瘫痪，在病理组织学上，神经组织呈现脱髓鞘改变。由于以上神经中毒症状出现在急性中毒后8～14天，故称为迟发性神经毒性作用。

（三）试剂与器材

1. 试剂　三邻甲苯磷酸酯（TOCP）、硫酸阿托品、解磷定、苏木素、无水乙醇、95%乙醇、石蜡（熔点54℃～56℃或60℃～62℃）、甲醛、二甲苯、HE染色及髓鞘染色所需试剂。

2. 器材　显微镜、切片机、温箱、水浴锅、解剖刀、解剖剪、镊子、骨钳、注射器等。

（四）试验方法

1. 试验动物　选用遗传背景明确、健康、步态正常的母鸡，鸡龄8～14个月，体重1.5～2kg。

2. 试验分组　剂量分组一般设三个不同剂量的试验组，一个阳性对照组和一个空白对照组。如赋形剂生物活性不明确时应增设一个赋形剂对照组。

(1)高剂量组：根据LD_{50}和预试验确定，一般采用LD_{50}剂量。观察期结束时可引起试验动物胆碱酯酶活性下降，以及部分动物死亡。

(2)低剂量组：根据预试验确定，可能引起或不引起迟发性神经毒性症状，其剂量一般为高剂量的1/10～1/5。

(3)中剂量组：在高低之间，其症状在Ⅱ级以上，少部分动物可达Ⅳ级。

(4)阳性对照组：500mg/kgTOCP（三邻甲苯磷酸酯）。

(5)空白对照：除不接触试验农药外，其他各种条件与试验组相同。

每剂量组母鸡数量应保证在观察结束时存活至少有6只。到期处死，如需观察恢复情况，则应在开始实验时增加延长观察期的动物数。

3. 给药方法　给药方式通常采用经口途径，包括灌胃、胶囊吞咽或咽峡部滴注等方法。给药前预处理隔夜禁食，经口给药前15min内，所有试验鸡均肌内注射10mg/kg硫

酸阿托品作保护处理。给药后，如需要可给予硫酸阿托品和解磷定。

4. 试验期限

(1)急性试验观察期一般为21天。如未见异常反应或有可疑反应时，须再次给药，继续观察21天。到期处死作组织病理学检查。如特殊需要，部分动物可延长2～4周或更长时间观察恢复情况。

(2)亚慢性试验连续给药13周并观察，停药后再观察1周。

5. 临床观察和检查

(1)中毒症状给药后每天观察记录试验鸡的外观体征、行为活动，特别是鸡的站立和运动姿势及运动失调程度。必要时可强迫母鸡活动，如爬楼梯等，以便观察迟发性神经毒性的最小反应。其典型症状的分级标准为：Ⅰ步态稍异常；Ⅱ步态严重异常；Ⅲ能以跗站立；Ⅳ不能站立。一般迟发性神经毒性反应在第7～10天开始出现并逐渐加重。

(2)每周称体重一次。

(3)病理组织学检查对死亡动物和到期处死动物检查延髓、桥脑、大脑皮质、小脑皮质、脊髓(包括上位颈段、胸段中部、腰骶结合部和坐骨神经等)并作组织切片。一般用灌流或其他方法，使被检脑神经组织固定在原来位置上。坐骨神经切片要作髓鞘和轴索的特殊染色。光镜观察，必要时可作电镜观察检查。

6. 数据处理与结果评价　阳性对照组动物中毒症状主要表现运动共济失调及瘫痪。在病理学检查中应可见典型脱髓鞘改变。阴性对照组动物应不出现以上症状及无病理学改变。将试验组动物与阴性对照组和阳性对照组动物进行比较，根据每组实验动物数及出现上述损伤或异常反应的动物数，计算出现损伤和异常反应的百分率，并用卡方检验等统计方法分析组间差异的显著性，以作出该受试物是否具有迟发性神经毒性作用的结论。

通过急性迟发性神经毒性试验，可以对受试物是否具有迟发性神经毒性作用及作用程度作出评价。

通过亚慢性迟发性神经毒性试验，可以对受试物是否具有亚慢性迟发性神经毒性作出评价；如果试验中呈现剂量-效应关系时，可对无作用水平值作出估计。

(五) 注意事项

1. 剥取神经组织时，切勿损伤神经组织。

2. 试验开始前，须熟练掌握病理组织学切片技术，包括取材、固定、包埋、切片及染色等。

第二节　神经毒理学形态学方法

一、通路示踪法

(一) 周围神经纤维的镀银染色

1. 目的　主要用于神经纤维、神经原纤维、神经末梢等的形态观察。

2. 原理　用氨银溶液浸染后，经焦性没食子酸使银还原成暗灰色或黑色沉淀而显示神经成分。

3. 试剂与器材　硝酸银、硝酸钾、氨基乙酸、焦性没食子酸、显微镜、切片机。

(1)酸性甲醛液配制：40%甲醛 25ml、蒸馏水 75ml、1%硝酸 0.2ml。

(2)镀银液配制：硝酸银 15g、硝酸钾 10g、蒸馏水 100ml、5%氨基乙酸 1ml。

(3)还原液配制：焦性没食子酸 10g、蒸馏水 450ml、无水乙醇 550ml、1%硝酸 2ml，配制 24h 后使用。还原液可保存数月。

(4)氯化金液配制：氯化金 1g、蒸馏水 200ml、冰醋酸 0.2ml。

(5)强化液配制：50%乙醇 100ml、苯胺 2 滴。

4. 操作步骤

(1)甲醛固定神经标本。

(2)神经标本经梯级乙醇脱水和二甲苯透明。

(3)石蜡包埋、切片，厚 5～10μm。

(4)玻片置于酸性甲醛液中 [illegible]min。

(5)蒸馏水洗 3 遍，5min。

(6)镀银液浸染，20℃～25℃ 15min 或 35℃ 4～5min。

(7)不经冲洗，将玻片置于已预热(40℃～45℃)的还原液中 1min。轻摇玻片并加入新还原液。

(8) 50%乙醇中冲洗 5～10s。

(9)蒸馏水洗 3 遍。显微镜下观察，若有必要，可从第 4 步重复，但须缩短镀银液浸染时间，降低还原液温度至 30℃。

(10)玻片置于氯化金液中调和染色，至切片呈棕黄色。

(11)玻片置于强化液中 15s。

(12)流水冲洗。

(13)5%硫代硫酸钠液固定数秒钟。

(14)流水冲洗。

(15)梯级乙醇脱水。

(16)二甲苯透明。

(17)中性树胶封固。

5. 轴突呈黑色或棕色。

6. 染色时也可省去第 10、11 步，直接进入硫代硫酸钠液固定。

(二) 改良的砂罗铬花青 R 髓鞘染色法

1. 目的　主要用于周围神经髓鞘的形态观察。

2. 原理　砂罗铬花青 R 染料与神经髓鞘反应形成蓝色。

3. 试剂与器材　砂罗铬花青 R(solochrome cyamine R)、荧光桃红(phloxine)、铁明矾、显微镜、切片机。

(1)砂罗铬花青 R 染液配制：砂罗铬花青 R(solochrome cyamine R)0.2g、蒸馏水 96ml、10%铁明矾 4ml、浓硫酸 0.5ml，依次溶解、充分混合，用小口砂塞瓶盛装，室温保存。染液呈紫棕色。

(2)荧光桃红染液配制：荧光桃红 0.5g、0.5%氯化钙水溶液 100ml。

4. 操作步骤

(1)甲醛固定神经标本。

(2)神经标本经梯级乙醇脱水和二甲苯透明。

(3)石蜡包埋、切片,厚4μm。

(4)石蜡切片浸入二甲苯中,然后逐级向下脱蜡。

(5)在切片上滴加砂罗铬花青R染液数滴(可用洁净纱布把切片周围水分抹干),室温下染色15～20min。

(6)倾弃染液,流水冲洗1～2min。

(7)10%铁明矾水溶液分化1～5min,至胶原纤维和肌纤维接近无色或淡灰色,髓鞘至清晰的蓝色为止,每次取出切片水洗应在显微镜下观察控制。

(8)流水冲洗5～10min。

(9)荧光桃红染液复染数秒钟。

(10)流水冲洗。

(11)梯级乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封固。

5. 结果分析与评价　髓鞘呈鲜蓝色,红细胞呈深蓝色,神经胞质、肌纤维及胶原纤维呈鲜红色。

(三)放射性核素标记的放射自显影术(ARG)

1. 原理　①将放射性标记氨基酸等经微量注射法注入CNS某个核团部位;②神经元胞体摄取后将氨基酸合成蛋白质,后者经顺行性轴浆运输运至轴突终末分布区;③放射性核素如^{3}H在动物体内衰变,不断放射出β粒子射线,可使覆盖组织切片的核乳胶感光。由于β射线与上述蛋白质结合在一起,故从胞体到纤维末梢的整个纤维行程,都有β射线射出来;④感光后的核乳胶经显影和定影后,即可显示出纤维束路的影像。

2. 评价　ARG的优点:①由于注射的氨基酸只由胞体合成蛋白质,没有标记过路纤维的问题;②ARG法可以显示各类纤维的联系,优于变性示踪束路法。

ARG法的缺点:①注射区有效范围很难确定,银粒密度从中心向外周逐渐变小,没有清晰分界;②实验周期太长,光镜ARG暴光期2～3个月;电镜ARG暴光期长达1.5～2年;③有跨突触运输的可能性。

(四)辣根过氧化物酶逆行示踪

1. 目的　追踪神经系统的纤维联系。

2. 原理　辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)是一种含血红素基的植物糖蛋白,将其注入动物体内,可沿轴浆运输线路示踪神经束路。HRP在H_2O_2存在的条件下,可催化外加联苯胺的氧化反应,反应产物具有特异性颜色,如与二氨基联苯胺(DAB)反应呈棕黄色,与四甲基联苯胺(TMB)反应呈蓝黑色,从而可将标记神经元及其突起显现出来。

3. 试剂与器材　大鼠、HRP、冷冻切片机。

4. 操作步骤　切断神经干,选内径与神经相似的12mmol/L长硅胶管,神经近断端插入管内,注入30%HRP溶液10μl,使神经断端浸泡在HRP溶液中;或直接在神经近断端涂抹HRP 1mg(分4～5次,每次间隔15～20min,共60～100min)。48～72h后,用4%多聚甲醛0.1mol/L磷酸缓冲液(pH7.4)700ml心脏灌注固定,切取与两侧神经相连的脊髓节段和后根感觉神经节,即按下法操作:

(1)4℃蔗糖缓冲液约4 72h。

(2)冷冻切片,厚40μm,浸于4℃ 0.1mol L磷酸缓冲液内24h。

(3)蒸馏水洗涤每次10~15s。

(4)室温下,置人孵育液内并不停摇动20min。孵育液:2.5ml 3,3',5,5 四甲基联苯胺(TMB)液,97.5ml硝普钠液,用时现配。

(5)室温下,0.3% H_2O_2 1.0~5.0ml加入10 ml装有切片的孵育液内20min。边加边摇动,H_2O_2 从1ml量开始,每次递加1ml,至神经元胞体内的标记产物量达到最高而又未显人工产物为度,即为 H_2O_2 的最佳用量。

(6) pH3.3缓冲液5ml+蒸馏水95ml清洗6次(0℃~4℃),总时间为30min。

(7)切片干燥4~15天。

(8)脱水、透明、封片。

5. 结果分析与评价 镜下胞体和树突中有不同程度的黑色颗粒胞浆沉淀物,胞体轮廓完整的细胞为标记的脊髓前角运动神经元或后根感觉神经元。坐骨神经的HRP逆行示踪法,在脊髓腰膨大灰质前角均能见到HRP标记的运动神经元,标记细胞主要集中于L5、L6、S1节段,HRP标记的感觉神经元主要集中于L5~6后根神经节,其密度高于灰质前角HRP标记的运动神经元。

二、化学神经解剖法

这类方法主要包括单胺类神经元的荧光组织化学技术、免疫细胞化学法,以及原位杂交法。

(一) 甲醛诱发荧光凝集法和乙醛酸诱发荧光法

甲醛诱发荧光凝集法:儿茶酚胺类的多巴胺、去甲肾上腺素和肾上腺素,以及5-羟色胺,都可与甲醛缩合形成一个四氢衍生物(四氢异喹啉THIQ),在有蛋白质存在的条件下,THIQ可催化脱氢反应,形成二氢化合物(二氢异喹啉DHIQ),后者在蛋白质中形成互变异构的醌式结构(tautomeric quinodal form),可产生荧光。

乙醛酸诱发荧光法:①单胺类物质与乙醛酸经过环化缩合反应,形成四氢异喹啉的衍生物(THIQ COOH),只有弱荧光;②再与乙醛酸结合,经过分子内酸的催化作用,产生强荧光的2 Carb,Me DHIQ,与其互变异构的醌式结构相平衡。

荧光组织化学法的优缺点:优点在于可特异性地显示单胺类神经元,尤其是儿茶酚胺类神经元,显示5-羟色胺能神经元的敏感性较差。其次,此法可在药物或机械致损的研究中,与ARG和HRP技术相结合。缺点在于切片在暗视野下观察,解剖局部定位困难。其次还应指出,表面上没有单胺类荧光的脑区,不一定没有该类神经元,必须以其他方法佐证。

(二) 免疫细胞化学法(immunocytochemistry,ICC)

1. 5-HT免疫组化法

(1)目的:观察含有5 HT的神经细胞。

(2)原理:5 HT特异性抗体与神经组织抗原结合,然后再与二抗结合,连接PAP加入DAB显色液显色。

(3)试剂与器材:兔抗5-HT抗体、羊抗兔IgG、4%多聚甲醛磷酸缓冲液、PAP溶液、

DAB显色系统、冷冻切片机。

(4)操作步骤

1)取SD大鼠，腹腔注射0.35%戊巴比妥钠深麻动物，开胸，经升主动脉灌注。先用生理盐水快速冲洗，至流出液体变淡后再灌入新配制的冷的4%多聚甲醛磷酸缓冲液，先快后慢，持续30min以上。对幼鼠，用静脉输液代替插管，注射器推注。灌注后立即开颅取脑，后固定2～3h(4℃)，然后置于30%的蔗糖磷酸缓冲液(4℃)。冷冻切片，片厚40μm。

2)免疫组化采用PAP法，DAB着色时用硫酸镍铵加强，切片依以下程序进行反应。

① 25% Triton X-100溶液，湿孵30min(37℃)。

② 3%牛血清白蛋白，湿孵30min(37℃)。

③ 1∶5000兔抗5-HT抗体，湿孵2～2.5h，37℃，然后移入冰箱48～60h，4℃。

④ 1∶60羊抗兔IgG，孵育30min(37℃)。

⑤ 1∶90 PAP溶液，孵育30min(37℃)。以上各步骤之间用0.01mol/L PBS漂洗。

⑥ 0.1mol/L醋酸缓冲液(pH6.0)漂洗10min。

⑦ 0.05%DAB、2.5%硫酸镍铵、0.01%H_2O_2的0.1mol/L醋酸缓冲液(pH6.0)反应5～10min。

⑧ 0.1mol/L醋酸缓冲液(pH6.0)漂洗5min，蒸馏水漂洗，贴片、晾干、脱水、透明、中性树胶封片。

3)对照实验分别用兔血清代替兔抗5-HT抗体，0.01mol/L PBS代替羊抗兔IgG，其他步骤同实验组。

(5)结果分析与评价：本实验反应产物为黑色，可清楚地显示胞体及纤维。

2. 神经丝等神经组织蛋白免疫组化法

(1)目的　利用特异性抗体(尤其是单克隆抗体)，对神经组织中某种特异性成分(抗原)，进行抗原-抗体反应，免疫反应具有高度选择性，因此可达到挑选出组织内化学特异性物质的目的。

(2)原理　神经纤维特异性抗体与神经组织抗原结合，然后加入的一抗与二抗结合，加入显色液显色。

(3)试剂与器材　一抗如鼠抗神经丝单抗、鼠抗GAP-43单抗、鼠抗α-tubulin单抗，辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠IgG、DAB显色试剂盒、冷冻切片机、大鼠。

(4)操作步骤

1)染毒大鼠，切取周围神经段液氮冷冻。

2)冷冻切片机切片10μm厚。

3)0.5%Triton X-100 PBS液，15min。

4)10%血清PBS液阻断非特异性抗体。

5)0.1mol/L Lysine-Tris-HCl缓冲液30min。

6)加入所需的单抗，如抗神经丝单抗、抗GAP-43单抗、抗α-tubulin单抗。4℃孵育18h。

7)PBS洗后，1∶100辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG 1h。

8)0.05%DAB+0.01%H_2O_2呈色反应。

(5)结果分析与评价：切片呈棕色，根据颜色深浅初步定性分析，也可用图像分析仪进行扫描定量。因单抗不同，染色后可在相应细胞的某些部位，如细胞核、胞浆着色显示，具有定性作用。

(6)注意事项

1)免疫细胞化学染色要求有空白对照，只是不加单抗，省去第6步。

2)显色系统相同，单抗不能同时加入，以免结果混淆。

第三节 神经毒理学生理学方法

神经递质定量测定

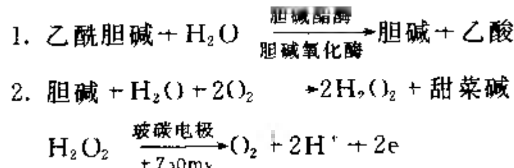
HPLC RE-ECD检测乙酰胆碱

(一)目的

观察毒物对神经系统乙酰胆碱(Ach)神经递质的影响。

(二)原理

乙酰胆碱是胆碱和乙酸形成的酯，含季胺离子，呈强碱性，在任何pH都呈离子状态，但它本身不能产生氧化还原电位。经反相高效液相柱层析分离得到乙酰胆碱，在柱后发生两个酶促反应后的终产物过氧化氢在玻碳电极表面形成氧化电位，测定过氧化氢电位的大小就可以反映乙酰胆碱的量。胆碱经过第二步反应也可生成H_2O_2，因此该方法可同时测定乙酰胆碱和胆碱。



(三)试剂与器材

1. 氯化乙酰胆碱、氯化胆碱、乙酰胆碱酯酶(AchE，Ⅲ型)、胆碱氧化酶、溴化氰活化的Sepharose 4B、二甲基3-氨基1-丙醇、溴乙烷、四甲基氯化铵、离子对B_8(辛烷基磺酸钠)、固定相YWG-$C_{18}H_{37}$(粒度10μm)。

2. Waters 6000A恒流泵、Rheodyne进样阀、0.46cm×25cmPE色谱柱、0.46cm×5cm酶衍生化柱、BAS产LC 4B电化学检测器。

(四)操作步骤

1. 内标ethylhomocholine bromide(EHC)合成：在一玻璃容器中加入一定量的8.45mol/L的二甲基3氨基-1丙醇，然后缓慢加入等量12.5mol/L的溴乙烷，室温下反应30min后加入乙醚，形成白色沉淀，真空干燥后用甲醛重结晶，－80℃保存。

2. 乙酰胆碱和胆碱标准品，内标EHC在临用前用双蒸水配成10mmol/L的储备液，－20℃保存。用时用0.1mol/L高氯酸稀释至所需浓度，4℃保存。

3. 衍生化酶柱的制作 溴化氰活化的Sepharose 4B凝胶作为酶共价结合的支持介质。称取一定量的凝胶置G3玻璃滤器内，按每克凝胶200mlHCl的量加入1mmol/L的HCl膨胀和冲洗凝胶后，加少量键合缓冲液(0.1mol/L $NaHCO_3$，含0.5mol/L NaCl，

pH8.3)冲洗凝胶。然后按酶活性单位(U)2∶1的量称取胆碱氧化酶和胆碱酯酶,溶于少量键合缓冲液中,将凝胶和酶混匀置于一小烧杯中避光,4℃过夜,使酶共价结合到凝胶上。次日用注射器均匀装入0.46cm×5cm(筛板5μm)的不锈钢柱中。

4. 样品处理 动物断头处死后,立即取脑称重,加入适量含内标的0.1mol/L $HClO_4$匀浆,45000×g离心20min,上清液即可进样。整个过程在冰浴中操作。若要同时测定组织中单胺递质含量,可将离心后的上清液过SephadexG 10凝胶柱,甲酸洗脱收集前2ml用于乙酰胆碱测定;继后流出液可用于单胺递质及代谢产物含量测定。

5. 色谱条件 泵流速1.2ml/min,工作电压+0.75V,氧化法,电化学检测器灵敏度5~10nA。纸速20cm/h,室温(2)±2)℃。流动相组成:0.07mol/L磷酸盐缓冲液,内加0.006%(W/V)Na_2EDTA,0.065%四甲基氯化铵,0.03%离子对B_8,pH7.3~7.5,G4玻璃漏斗脱气后使用。

(五)结果分析与评价

每个样品及标准品内所加内标EHC含量相等,因此,样品中乙酰胆碱和胆碱的峰高与EHC峰高之比值与标准品中它们与EHC峰高之比进行比较,根据标准品中每种物质的量就可推算出样品中的含量,具体计算公式如下:

[(样品比值/标准品比值)×标准品浓度(nmol/ml)]/组织重量(g/ml)=样品中乙酰胆碱的含量(nmol/g)

根据试验组与对照组的比较,差异有明显的,可认为毒物对乙酰胆碱神经递质有影响。

(六)注意事项

1. 流动相pH是影响分离的一个重要因素。pH7.2~7.5时分离效果最好。

2. 增加TMA的浓度可以降低容量因子,增加乙酰胆碱、胆碱的蜂高,而不影响基线分离;但TMA浓度过高会影响酶的功能。

第四节 神经毒理学分子生物学方法

一、神经丝蛋白免疫印迹法

(一)目的

观察毒物对神经丝蛋白表达的影响。

(二)原理

神经丝特异性抗体与神经组织抗原结合,然后再加入二抗,ECL试剂暴光,koda自动洗像机显示胶片。

(三)试剂与器材

白色Leghorn母鸡,18月龄,重1.5~2.0 kg,PMSF、DFP,小鼠抗NF H、NF M、NF L一抗,HRP抗鼠IgG、ECL试剂。

(四)操作步骤

1. 坐骨神经组织匀浆 取双侧坐骨神经组织样品(约0.5g)放入陶瓷研钵,加液氮使坐骨神经速冻,用研棒在液氮中将坐骨神经研成蛋白碎末,然后将坐骨神经碎末移入玻璃

匀浆器。加 2ml 预冷的匀浆缓冲液(10mmol/L Hepes, pH 6.8, 50mmol/L NaF, 1mmol/L EGTA, 2mmol/L levamisol 和 1mmol/L PMSF),放玻璃匀浆器入盛有冰水的烧杯内,上下匀浆五次,用吸管将匀浆液移入 50ml 离心管。放离心管在冰中 30min。在 15500r/min 离心 30min,4℃。吸出上清液到 2ml 塑料管, -70℃保存,作为坐骨神经上清液样品备用。用旋涡混悬器,加 2ml 匀浆缓冲液重混悬样品沉淀。用吸管将沉淀移入 3ml 塑料管,-70℃保存,作为坐骨神经沉淀样品备用。

2. SDS-PAGE

(1)制备分离胶:根据表 7-1 加试剂,用混悬器混合分离胶。

表 7-1 制备 7.5% 分离胶所加试剂

	1 plate	2 plates	4 plates
30% acrylamide (ml)	8	16	32
di H_2O (ml)	15.5	31	62
resolving buffer(ml)	8	16	32
10% SDS (μl)	320	640	1280
10% APS (μl)	160	320	640
TEMED (μl)	16	32	64

尽快用吸管灌注分离胶,靠玻璃板一侧灌注至标记线。加 1ml H_2O 饱和的丁醇(butyl alcohol)封在胶表面,然后聚合 30min。

(2)制备浓缩胶:用吸管移去丁醇,用滤纸吸干残留的丁醇。按下表 7-2 混匀浓缩胶,灌注浓缩胶至接近玻璃板,然后迅速插入梳子。

表 7-2 制备 4%浓缩胶所加试剂

	1 plate	2 plates	4 plates
30% acrylamide (ml)	1.33	2.66	5.32
di H_2O (ml)	6	12	24
stacking buffer(ml)	2.5	5	10
10% SDS (μl)	100	200	400
10% APS (μl)	50	100	200
TEMED (μl)	10	20	40

聚合 30min 后上样。在聚合时,打开沸水浴开关,准备沸水和电泳缓冲液。

(3)上样:轻轻拔出梳子,用电泳缓冲液填充梳子孔,然后用吸管把电泳缓冲液吸干净。准备上样。

从坐骨神经沉淀样品中取 150μg 蛋白或从坐骨神经上清液样品中取 500μg 蛋白,放入带螺旋口的小塑料试管(1.5ml),然后加 di H_2O 至 500μl,加 250μl 3×SDS 上样缓冲液,比例 2∶1。制成 10 个上样量。混合样品,旋紧管盖,放入沸水中 5min,然后拿出样品管冷至室温。

混匀样品后，每孔加 75μl（沉淀 15μg 孔，上清液 50μg 孔），每一个样品加两个孔。加电泳缓冲液充满孔顶部，移走气泡。

在胶顶部放一橡胶垫。电泳槽盖盖在胶顶部，用黑色固定栓使胶和电泳槽盖连接。加小量电泳缓冲液进入电泳槽盖，观察是否泄露，然后加 15μl 溴酚蓝作为指示剂。

(4)跑胶：放玻璃板进入电泳设备，加电泳缓冲液到指定的位置，加剩余的电泳缓冲液到电泳槽盖内，盖好电泳盖，连接好正负极。打开冷水管，使循环水流动。启动电泳设备的电源，使电流控制在 40mA 胶，约 2～3h。

3. 免疫印迹

(1)转膜：取两张 Whatman 3mmol L 滤纸和一张硝酸纤维素膜，大小与胶相同(12.5cm × 16.5cm)。在一个盛有大量转移缓冲液的盘内进行组装三明治膜。

1)带有阳极的塑料格框。

2)加海绵垫。

3)放一张 Whatman 3mmol L 滤纸。

4)放硝酸纤维素膜。

5)放胶。需仔细拿起，以免撕破。

6)放一张 Whatman 3mmol L 滤纸。

7)放一海绵垫。

8)最后放另一块带有阴极的塑料格框。

注意：在整个过程中需要移除所有的气泡。

放组装好的三明治膜进入转膜盒里，加 4L 转膜缓冲液。将转膜设备放入冷房，打开电源，用 20V(或 I = 0.15A)过夜，然后增到 100V 持续 2h，或用最大电压(使电流从 0.8A 开始到 1.5A 结束)持续 1.5h。

(2)杂交：拆除三明治膜。用 0.9% NaCl 洗膜，15min。用丽春红(Ponceau S)染膜 1min，观察转膜效果。用水洗 10min × 2，然后 1× TBST 150ml，10min×2，直到红颜色消失。加封闭缓冲液 60ml，震摇 1h。加 10μl 一抗(如：抗 NF H，小鼠)进入 10ml 封闭缓冲液(1∶1000)，充分混匀，加入盛有硝酸纤维膜的塑料袋内。封口，震摇 2h。打开塑料袋，取出硝酸纤维膜，放入塑料盒。用水洗 10min×2，然后 1×TBST 200ml，10min×5。(如果时间不够，可放入冷房第二天再继续)。换新的封闭缓冲液 60ml，震摇 30min。加 10μl 二抗(HRP 抗鼠 IgG)与 15ml 封闭缓冲液混合(1∶1500)。封口，震摇 1h。取出硝酸纤维膜放入 H_2O 中，洗 10min ×2，然后 1× TBST 200ml，10min×5。混合 Western Blotting 测定试剂(ECL ™ RPN 2106 made by Amersham Pharmacia Biotech Inc.)，试剂 1∶试剂 2 1∶1。首先加试剂 2，1min 后加试剂 1，反应 1min。取出硝酸纤维膜，用塑料薄膜包围硝酸纤维膜，防止 Western Blotting 测定试剂污染胶片，放硝酸纤维膜进入黑盒，去暗室。放高敏感胶片(hyperfilm)，暴光 15s 或根据具体情况确定暴光时间，然后用 Koda 全自动冲洗设备，冲洗胶片。

(五) 结果分析与评价

杂交带用 Molecular Dynamics Personal Densitometer 扫描，用 IPLab Gel 分析软件分析杂交带密度，密度结果用 one way ANOVA 和 Dunnett's 进行两两比较分析。$P<0.05$ 被认为有统计学意义。

二、神经丝 mRNA 含量测定

(一) 目的

观察毒物对神经丝 mRNA 含量的影响。

(二) 原理

northern blot。

(三) 试剂与器材

DFP、atropine 和 eserine，[α ³²P]dCTP(3000Ci mmol)、Nylon 膜、随机引物标记系统、ULTRAhyb 杂交液、大鼠 NF L clone、NF M (63405)、NF-H (63407)、18S RNA (HHCSA65)、β-actin (HFFBBCC49)clones，白色 Leghorn 母鸡。

(四) 操作步骤

1. 制作 RNA 胶

(1)滤膜过滤的蒸馏水和 70%的乙醇分别清洗平板电泳、胶盘样品梳和胶盘坝，以去除 RNAase 污染。

(2)安装胶盘、样品梳和盘坝。配制 80ml Agarose Formaldehyde 胶。取 0.8g agarose，加 57.6ml DEPC 处理的高压灭菌 H_2O，在微波炉内加热(大约 40s)溶化。然后放入 60℃ 水浴，加 8ml 10×MOPS 和 14.4ml Formaldehyde(HCHO)，混合后，灌入胶盘。

(3)保持 30min。

(4)从胶盘中取出梳子和胶盘坝。

(5)灌注电泳缓冲液(1×MOPS)

90ml 10×MOPS

810ml DEPC 处理的 H_2O

2. 制备上样样品

(1)10μg RNA 放入 eppendorf 管，放入真空干燥器真空干燥 40min 至干，加 3μl DEPC 处理的 H_2O，然后加 10×MOPS 1.7μl，HCHO 3μl，Formamide 8.3μl，混合，离心。

(2)放入 55℃ 水浴 15min。

(3)加 RNA 上样缓冲液 4μl，混合，离心。

(4)上样，每孔 20μl。Eppendorf 管样品全部加到样品孔。

3. 跑胶

(1)盖好盖板，插上正负极，打开电源，调节电压为 50V，30min。

(2)当指示剂跑出样品孔后，增加电压至 100V，约 2.5h。

4. 转 RNA 到 Nylon 膜

(1)准备无 RNase 的玻璃盘。清洗后的玻璃盘放入高压消毒装置中高压 20min。

(2)玻璃盘冷却后加 DEPC 处理的水，取出 RNA 胶，放入盛有 DEPC 处理水的玻璃盘内，使水能盖过 RNA 胶。

(3)浸泡 5min×4，用真空将水吸干(直接倒掉容易使胶破碎)。

(4)加 600ml 20×SSC，用摇床轻轻震摇 45min。

(5)Whatman 3mmol L 滤纸灯心方法

1.准备转膜盘，先用过滤水后用 70%乙醇冲洗，然后灌入足够的 20×SSC。

②剪一张 Whatman 3mmol L 纸，大小 11.5cm×23cm，用 20×SSC 浸湿。

③剪一张 nylon 膜(11.5cm×14.5cm)，在无 Rnase 的盘中注入 DEPC 处理水，并将 nylon 膜放入，浸泡 5min。

④把胶放在浸湿的 Whatman 纸上。

⑤把浸湿的 nylon 膜放在胶上，用高压过的玻璃棒赶走气泡。用铅笔标下记号，记住正反面和加样顺序。

⑥用塑料纸包围。

⑦放 2 张事先浸湿的 Whatman 纸(11.5cm×14.5cm)在 nylon 膜上。

⑧把约 10cm 厚和 Whatman 纸一样大小的草纸堆积在 Whatman 纸上面。

⑨放一塑料盘在草纸上面，并加一盛有约 500ml 水的玻璃瓶，用支架靠住玻璃瓶以免歪倒，持续 16h。

5. 准备膜杂交

(1)移去草纸和 Whatman 滤纸，用铅笔在膜上标记各个加样孔位置和反正面，以免混淆。

(2)用 2×SSC 浸膜，但不多于 5min 以免 RNA 丢失。然后把膜放在 Whatman 3mmol L 滤纸上，吸去液体并晾干。

(3)在 80℃烤箱内烤 2h。

(4)UV 光照射膜每一面 5min。

(5)在 4℃保存膜或准备杂交。

6. 杂交

(1)打开杂交炉电源，使温度到 42℃。

(2)用 70%乙醇×3，冲洗杂交管，然后 80℃烤干。放烤好的转移膜进入杂交管。

(3)加 10ml 50% formamide(5ml formamide，5ml DEPC 处理的 H_2O)进入杂交管，在 42℃杂交炉内旋转 15min，使蓝颜色移去，然后倒掉。加 ULTRAhyb 液 15ml，42℃，3h。(ULTRAhyb 液用前应在 68℃加热至溶解)。

7. 标记探针

(1)用 Random Primers DNA 标记系统(Cat. No. 18187-013，Life Techologies$_{TM}$)。

H_2O	22	21μl
需要标记的 cDNA	1	2μl

100℃，5min，然后迅速插入冰中冷却 5min。每管在冰上加 15μl Random Primers 缓冲混合液。

(2)加 4μl dATP、4μl dGTP、4μl dTTP、10μl dCTP($\alpha^{32}P$)简单混合。注意放射保护。

(3)加 1μl Klenow Fragment，轻轻但彻底混合。

(4)在 25℃孵育 2h。

(5)加 5μl Stop Buffer，混匀后离心。

(6)制作 1ml Sephadex G-50 层析柱纯化标记探针。

加高压玻璃棉堵塞注射器出口，将注射器放入 10ml 的离心管内，底部加 1.5ml 的 eppendorf 管以接受液体。加 G-50(高压处理的 TE 浸泡，pH8.0)入 1ml 注射器内，离心

3 次，每次 3min，直至 Sephadex G-50 填满注射器。先加标记的探针再加 TE buffer 40μl，离心 1000r/min，5min，丢弃 G-50 层析柱（层析柱有放射性物质，注意妥善安排）。底部 eppendorf 管的离心液是纯化好的标记的 cDNA 探针。

(1)测定探针放射强度：取 5μl 标记探针加 495μl TE buffer，混匀。取 10μl 进入闪烁瓶内，加闪烁液 12ml，计数 cpm 值。

(2)根据探针 cpm 值，计算所需要的探针量。

例如：β-actin cDNA 探针 cpm 值是 80 000

80 000×500/10×5＝800 000cpm/μl

100×10^5 cpm/μl：8×10^5 cpm/μl≈13μl

(3)加热 cDNA 探针 100℃ 5min，立即放入冰中冷却。

(4)取 13μl 标记探针，与 1ml ULTRAhyb 液在 42℃混合，然后用吸管加入杂交管。注意要加在底部先与管内的杂交液混匀。

(5)42℃　杂交 16h。

8. 冲洗胶片

(1)倒掉杂交液（有放射物质），从杂交管中取出膜放入 RNase free 的玻璃盘，用 2×SSC/0.1%SDS 200ml 清洗，5min×3。

20×SSC 20ml

10% SDS　2ml

加 DEPC 处理的水至 200ml.

(2)然后在调温摇床用 0.1×SSC/0.1%SDS 300ml，45℃清洗 45min。

20×SSC　1.5ml

10% SDS　3ml

加 DEPC 处理水至 300ml.

(3)用 300ml 0.1×SSC/0.1%SDS 在室温浸泡膜 5min。

(4)用探测器探测放射强度，根据强度确定暴光时间。其他操作与 Western Blotting 相同。装好的胶片在 −70℃暴光，根据强度可曝光 8～72h。

(五) 结果分析与评价

杂交带用 Molecular Dynamics Personal Densitometer 扫描，用 IPLab Gel 分析软件分析杂交带密度，密度结果用 one-way ANOVA 和 Dunnett's 进行两两比较分析。$P<0.05$ 被认为有统计学意义。

(六) 注意事项

所用的试剂、药品和器械需用高压灭活。

第五节　电生理实验方法：膜片钳

(一) 目的

离子通道是细胞内部与外环境的联系通道，是细胞兴奋性和生物电信号的结构基础。利用膜片钳技术可以记录离子通道电流，研究通道门控机制，揭示细胞生理活动，观察外来化合物对离子通道的毒理作用。通过本次实习了解膜片钳技术。

(二) 原理

膜片钳技术是用玻璃微电极接触细胞膜，在电极尖端与膜之间形成达吉(10亿)欧姆(GΩ)的高阻抗封接，使与电极尖端笼罩下的那片细胞膜事实上与膜的其他部分在电学上绝缘，在此基础上固定电位，用一个极为敏感的电流监视器(膜片钳放大器)对此膜片上的离子通道电流进行监测记录的方法。

(三) 试剂与器材

1. 细胞标本的制备 视实验需要而定(具体细胞由教师决定)。

2. 重要器材 玻璃微电极、微电极拉制仪、微电极抛光仪、膜片钳放大器、微操纵仪、倒置显微镜、计算机及膜片钳软件等。

3. 试剂 胶原酶、胰蛋白酶、电极内液、细胞外液等。

(四) 操作步骤

1. 微电极的拉制和充灌

(1)微电极的拉制：玻璃毛细管经微电极拉制仪两次垂直拉制而成，利用金属丝通过大电流使玻璃管加热重力拉断，第一步将玻璃管软化，拉长一个短距离，使玻璃管变细；随后用较小的电流对玻璃管加热作第二次拉伸，使玻管分成对称的两半，尖端直径1.0～1.5μm。

(2)微电极的充灌：将电极尖端浸于电极内液中，利用毛细现象使尖端部分充满液体，然后用注射器从尾部反向充灌(如果有气泡，手持微电极使其尖端朝下，指敲管壁弹出气泡)。电极内液约为电极长度的1/3即可。

2. 高阻封接

(1)电极入液：在粗调控制下逐步推进电极使尖端进入液面，液相电位补偿。

(2)形成吉欧封接：继续推进电极接近细胞，再以微操纵仪调节电极尖端至细胞膜，给电极腔内施加负压促使封接阻抗进一步增加，从而形成吉欧封接。然后依据设计形成特定的记录模式。

(3)参数补偿：改变钳制电位，快电容电流和慢电容电流补偿，以及补偿电极和膜碎片形成的串联阻抗。

3. 数据记录 当各参数补偿之后，即可作电流记录。

4. 记录模式 在膜片钳技术的发展过程中，形成了四种记录模式，即细胞贴附式、全细胞式、膜外面向外式、膜内面向外式。

(1)细胞贴附式：将微电极贴附在细胞膜上对单离子通道电流进行记录的模式。其优点是在保持正常的细胞内环境下观察记录离子通道的活动。

(2)全细胞式：在贴附式膜片的基础上，在电极内施加较强负压以吸破膜片，则得到全细胞记录模式，此时细胞膜与电极内部构成一连通的整体，允许内液和胞浆之间实现扩散性交换，从而为从电极向细胞内注入某种物质提供有效途径。

(3)膜外面向外式：从全细胞式将微电极向上提起，膜的周边断裂，断口相互靠拢自然融合。由于胞膜内侧面对微电极腔，外侧面自然封闭而对外，所以这个模式称为膜外面向外式，可以自由改变细胞外液的成分。

(4)膜内面向外式：从细胞贴附式将微电极向上提起，膜片即从细胞体上被切割分离下来，分离的膜片，形成内面向外的模式。这种模式可自由调控细胞内液。

（五）结果分析与评价

通过离子通道电流和门控机制变化、药物激活或阻塞作用来辨识和分析离子通道类型与毒物的作用。

（六）注意事项

1. 细胞外液和电极内液渗透压和 pH 值的差异将严重影响多种离子电流。

2. Ag-AgCl 电极只有在含有 Cl^- 的溶液中才呈现良好的导电性能。

3. 溶液中外来物质的污染物可能影响离子通道，因此溶液必须使用高纯度的化学试剂。

4. 信号的采样频率和滤波必须设置合理，真实地记录信号，否则将会产生混叠现象，导致信号失真。

（肖 杭）

第六节 行为致畸毒性测试方法

现常用的测试组合有两套。一是辛辛那提行为畸胎学测试组合（cincinnati behavioral teratology test battery，CBTTB），一是行为畸胎学研究组合（the battery used in collaborative behavioral teratology study，CBTS）。

一、行为畸胎学测试组合

主要侧重学习能力测试。如近期记忆包括 T 型迷宫、Y 型迷宫、水迷宫等；学习能力包括主动回避反射、被动回避反射、光鉴别试验、运动鉴别试验等。

记忆力测验：

长期接触某些化学物质，可能出现神经衰弱综合征，此时往往伴有记忆力的减退。因此通过实验了解毒物对动物记忆力的影响，可以作为毒物是否引起大脑皮质功能障碍的客观指标。目前一般采用动物迷路试验来观察毒物对记忆力的影响，这也是条件反射实验方法的一种。迷路试验方法甚多，一类系与防御运动反射相结合，另一类系与食饵运动反射相结合。

（一）小鼠 Y 型迷宫实验

1. 目的 通过实验了解毒物对动物记忆力的影响。

2. 原理 在一个三岔迷路内，分安全区和电击区。给小鼠电击刺激，迫使它逃避并获得迅速找到安全区的记忆力。观察毒物是否影响鼠的这种记忆力。

3. 试剂与器材 实验用 Y 型盒，共分相等的三岔，称为甲、乙、丙三臂。相邻各臂间均成 120°夹角。盒臂可用木制或塑料等绝缘材料制成，供小鼠实验用的各臂均宽 8cm，长 18cm，高 15cm。盒底铺设导电用的铜丝（直径 1mm 左右），其间隔 3～5mm，按正负极相间而排列。甲臂的一端底部不铺设铜丝，称为安全区，安全区的长度为 11cm。在丙臂一端设有一闸门，内为电击前放置小鼠的起步点。Y 型盒上覆盖玻璃或有机玻璃以供观察。底部铺设的铜丝与电源之间，可接调压变压器，一般对小鼠电击电压为 30～60V。

4. 操作步骤

(1)实验时将鼠放在起步点,使适应环境一分钟。打开闸门并按动电钮,给鼠以电击刺激。根据鼠的反应而调节电压,以能引起鼠奔跑逃避为度(如鼠吱吱嘶叫表示电压过高;如鼠无运动反应,说明电压过低;如电压超过 90V,可能引起鼠心肌损害或致死)。鼠在奔逃中,最后偶然窜到无电击的安全区。让鼠在此停留 10s,以巩固记忆。

(2)将鼠从安全区取出,放回起步点休息 1min。再给以第 2 次电击刺激,鼠又可逃至安全区,如此反复训练,以鼠在多电击后能从丙臂直接进入安全区的反应称为"正确",如进入乙臂再进入安全区,或进入乙臂又返回丙臂再进入安全区皆为"错误"。直至鼠在连续 10 次电击中有 9 次"正确",只有 1 次"错误",即作为训练成功(或称获得记忆)。

(3)给训练成功的鼠染毒后,再进行上述测验。即连续给予电击,直至鼠在连续 10 次电击中"正确"反应达到 9 次为止。此时记下电击测验的总次数并减 10。然后求得全组的平均值与染毒前作比较,亦可每只动物自身作比较,观察染毒前后记忆力变化情况,以评价毒物对记忆力的影响。同时对照组动物也需比较前后两次的测验结果有无变化,以除外其他因素的干扰。

5. 结果分析与评价　现介绍计算记忆力保存率的评价方法,供参考。

$$记忆力保存率(\%)=\frac{A-B}{A}\times 100$$

式中:A　染毒前在连续 10 次电击中有 9 次"正确"的总次数减 10(即获得记忆所需电击的总次数减 10)。

B　染毒后在连续 10 次电击中有 9 次"正确"的总次数减 10。

例:给小鼠以二硫化碳吸入染毒 2h,染毒浓度为 $20g/m^3$。染毒前总计测定 14 次时,达到 9 次正确。次日染毒,染毒后,30min 再测定,总计测定 12 次时,达到 9 次正确。求在二硫化碳的这种条件影响下的记忆力保存率。

代入公式

记忆力保存率(%)=[(14−10)−(12−10)]/(14−10)×100=(4−2)/4×100=50

反之,也说明二硫化碳染毒,可使小鼠记忆力减退 50%。

6. 注意事项

(1)实验用的小鼠需经过挑选,一般用成年小鼠 20~26g,并测量两前肢间皮肤电阻,要求在 150~300kΩ 之间为合适。

(2)电刺激以快速断续刺激为宜,不要持续通电,以免小鼠寻求机会使四肢站立在二根正极或二根负极铜棒上以逃避电击。

(3)实验室环境条件要恒定、安静,光线不宜太强,室温最好在 18℃~30℃之间,染毒前后的条件要一致。

(4)每次电击后,不得将小鼠从安全区经迷路赶回丙臂,而必须从安全区取出,并直接放回起步点。

(5)如有条件可用电路设计,使丙、乙臂亦可成安全区,甲、乙臂亦可成起步点,这样可避免反复抓放动物的干扰作用。如再在甲、乙、丙臂顶端装有灯光,则可同时用灯光电击两种信号作测验。

(6)一般每只小鼠要训练 10~20min,每组小鼠要 10 只左右。

(7)这种记忆力小鼠可保存 3~4 周,以后可逐渐消失。

（二）小鼠跳台实验

1. 目的　通过实验了解毒物对动物记忆力的影响。

2. 原理　反应箱底铺有通36V电的铜栅，小鼠受到电击，其正常反应是跳上箱内绝缘的平台以避免伤害性刺激。多数动物可能再次或多次跳至铜栅上，受到电击又迅速跳回平台，如此训练5min，并记录每鼠受到电击的次数或叫错误次数，以此作为学习成绩。24h或48h重作测验，此即记忆保持测验。记录受电击的动物数、第一次跳下平台的潜伏期和3min内的错误总数。停止训练5天后（也可以在训练后的一周、两周或其他时间点）进行记忆消退实验。

3. 试剂与器材

(1)跳台仪：该装置为10cm×10cm×60cm的被动回避条件反射箱，用黑色塑料板分隔成5间。底面铺以铜栅，间距为0.5cm，可以通电，电压强度由一变压器控制。每间左后角置一高和直径均为4.5cm的绝缘平台。

(2)试剂：樟柳碱、环己酰亚胺、乙醇。

4. 操作步骤　末次给毒物后次日（或一次给毒物后1h）开始训练。将动物放入反应箱内（台上、台下）适应环境3min，然后将动物放置反应箱内的铜栅上，立即通以36V的交流电。动物受到电击，其正常反应是跳回平台（绝缘体），以躲避伤害性刺激。多数动物可能再次或多次跳至铜栅上，受到电击又迅速跳回平台上。训练一次后，将动物放在反应箱内的平台上，记录3min内各鼠跳下平台的错误次数和第一次跳下平台的潜伏期，以此作为学习成绩（记忆获得）。24或48h后进行重测验，将小鼠放在平台上，记录各鼠第一次跳下平台的潜伏期、各鼠3min内电击次数和受电击的动物数总数，同时计算出现错误反应的动物的百分率（受电击的动物数占该组动物总数的百分率）（记忆巩固）。停止训练5天后（包括第5天）可以在不同的时间进行一次或多次记忆消退实验（记忆再现，方法同重测验）。

5. 结果分析与评价　若受试组与对照组比较，潜伏期、错误次数或跳下平台的动物数差异有显著性，表明毒物引起动物记忆力改变。

6. 注意事项

(1)动物在24h内有其活动周期，不同时相处于不同的觉醒水平，故每次实验应选择同一时相（上午8～12点或下午1～4点），前后2天的实验要在同一时间内完成。

(2)实验应在隔音，光强度和温、湿度适宜且保持一致的行为实验室进行。

(3)减少非特异性干扰，如：情绪、注意、动机、觉醒、运动活动水平、应激和内分泌等因素。

（三）小鼠避暗实验

1. 目的　通过实验了解毒物对动物记忆力的影响。

2. 原理　利用小鼠嗜暗的习性设计一个装置，一半是暗室，一半是明室，中间有一小洞相连。暗室底部铺有通电的铜栅，并与计时器相连，计时器可自动记录潜伏期的时间。小鼠进入暗室即受到电击，计时自动停止。

3. 试剂与器材

(1)避暗仪：该装置分明暗两室。明室大小为12cm×4.5cm，其上方约20cm处悬一40W钨灯丝。暗室较大，大小为17cm×4.5cm，两室之间有一直径约3cm的圆洞。两室

底部均铺以铜栅。暗室底部中间位置的铜栅可以通电，电击强度可在一旋钮上任意选择。一般采用40V电压。暗室与计时器相连，计时器可自动记录潜伏期的时间。

(2)试剂：樟柳碱、环己酰亚胺、乙醇。

4. 操作步骤　末次染毒后次日(或一次染毒后1h)开始训练。实验时将小鼠面部背向洞口放入明室，同时启动计时器。动物穿过洞口进入暗室受到电击，计时器自动停止，取出小鼠，记录每鼠从放入明室至进入暗室遭电击所需的时间，此即潜伏期，训练5min，并记录5min内电击次数(记忆获得)。24或48h后重作测验，记录每只动物进入暗室的潜伏期和5min内的电击次数，并计算5min内进入暗室(错误反应)的动物百分率(记忆巩固)。停止训练5天后可以在不同的时间进行一次或多次记忆消退实验(记忆再现)。

5. 结果分析与评价　若受试组小鼠进入暗室的潜伏期、错误次数或进入暗室的动物数与对照组有显著性差异，表明毒物对小鼠记忆有损害作用。

6. 注意事项　同小鼠跳台实验。

(四) 大鼠穿梭箱实验(双向回避实验)

1. 目的　通过实验了解毒物对动物记忆力的影响。

2. 原理　条件反射。

3. 试剂与器材

(1)仪器：大鼠穿梭箱。该装置由实验箱和自动记录打印装置组成。实验箱大小为50cm×16cm×18cm。箱底部格栅为可以通电的不锈钢棒，箱底中央部有一高1.2cm挡板，将箱底部分隔成左右两侧。实验箱顶部有光源和蜂鸣音控制器，自动记录打印装置可连续自动记录动物对电刺激(灯光或和蜂鸣器)的反应和潜伏期，并将结果打印出来。

(2)试剂：樟柳碱、环己酰亚胺、乙醇。

4. 操作步骤　将大鼠放入箱内任何一侧，20s后开始呈现灯光或蜂鸣音，持续20s，后10s内同时给以电刺激(100V，0.2mA，50Hz，AC)。大鼠在遭电击后即逃避，必须跑到对侧顶端，挡住光电管后才可中断电击，此为被动回避反应，在每次电击前给予条件刺激，反复强化后，大鼠在接受条件刺激后即跳向对侧并挡住光电管而逃避电击，此为主动回避反应。每隔天训练一回，每回50次，连续训练4～5回后，动物的主动回避反应率可达80%～90%以上。根据打印结果分析如下指标：动物反应次数、动物主动回避时间、动物被动回避时间、动物主动回避率。停止训练5～30天内，分2～3次测定其记忆消退情况。

5. 结果分析与评价　若实验组主动和(或)被动回避时间与对照组相比，差异有显著性，可判定毒物对动物记忆力有影响。

6. 注意事项　同小鼠跳台实验。

二、行为畸胎学研究组合

行为畸胎学研究组合主要侧重运动功能检测。行为致畸的危险度评价不需对表7-3中所列的全部内容进行测验，选某种功能中有代表性的部分测验即可。也可根据化学物可能的致畸特性使测试组合有所侧重，这更有利于对化学物特异行为作用的评价。

(一) 活动度测定

此种方法很少能应用于人。自主的活动度在啮齿类动物主要用于行为药理及行为毒理。单一项活动度测试在现代毒理学仅测定一般活动及行为评价，现已能进行定量评价。

此方法为在一特定环境装有定位的红外线光束，记录动物于固定的时间内活动时切断光束的次数。它可监测垂直的及水平位的动物活动次数，每 10min 测一次，计 3 次，合计 30min。正常的啮齿类动物典型表现为活动度逐渐减少。其他有用的迷路装置如 8 字型迷宫。

表 7-3 行为畸胎学研究组合试验表

体格发育	
一般发育情况	体重，张耳，出牙，开眼，睾丸下降，阴道张开
反射及感觉功能	平面翻正
神经运动协调	空中翻正
听觉	听觉惊愕
躯体感觉运动	断崖回避 负趋地性
视觉	视觉定位
嗅觉	归巢
痛觉	夹尾
运动和协调功能	
运动发育	转体
耐力	前肢悬挂 爬绳
神经肌肉成熟	转棒 游泳 足展开
活动度	开阔场地 踏轮
认知能力	
近期记忆	T 型迷宫 Y 型迷宫 水迷宫
学习能力	主动回避反射，被动回避反射，光鉴别试验，运动鉴别试验
社会行为	
性功能	交配试验
群体行为	群居 隔离测试

(二) 运动协调功能测试

1. 转棒实验

(1)目的：测定动物神经肌肉协调功能。

(2)原理：小鼠跌落转棒时的转速可以反映动物神经肌肉协调能力。

(3)试剂与器材：一棒(直径 4.5cm，长 60cm)支于高 30cm 的可转动的支架上，使棒能水平旋转，且在棒上加 6 块圆片，将棒分成 6 节。

(4)操作步骤:测试时,每节段上放一只小鼠,以固定或加速的速度旋转。开始训练小鼠 2h,以测定其平衡力,转速为 9r/min 后开始正式试验,从 9r/min 逐渐加速至 12、16、20、22r/min,记录小鼠跌落转棒时的转速。

(5)结果分析与评价:若染毒组跌落转棒时的转速明显小于对照组,且差异有显著性,表明毒物对运动功能有影响。

(6)注意事项:对训练不合格的小鼠应剔除。

2. 游泳耐力实验

(1)目的:观察小鼠的运动功能。

(2)原理:游泳时间的长短可以反应动物运动耐力的程度。

(3)试剂与器材:游泳箱(大小约 50cm×50cm×40cm)、电子天平、铅皮。

(4)操作步骤

1)选用成年小鼠,体重 18～22g。购买的动物适应环境 3 天后进行游泳筛选试验。

2)实验设一个剂量组或多个剂量组,设一个空白对照组。染毒时间可一次,也可多次。

3)末次染毒 30min 后,置小鼠在游泳箱中游泳。水深不少于 30cm,水温 25℃±0.5℃,鼠尾根部负荷 5%体重的铅皮。记录小鼠自游泳开始沉入水底的时间,作为小鼠游泳时间。

(5)结果分析与评价:若染毒组游泳时间明显小于对照组,且差异有显著性,表明毒物对运动功能有影响。

(6)注意事项

1)每一游泳箱一次放入的小鼠不宜太多,否则互相挤靠,影响实验结果。

2)水温对小鼠的游泳时间有明显的影响,因此要求各组水温控制一致,每一批小鼠下水之前都应测量水温,水温以 25℃为宜。如果过低可能引起小鼠痉挛,影响实验结果;过高(30℃)则游泳时间太长不便于操作。

3)铅皮缠绕松紧应适宜。

4)观察者应在整个实验过程中使每只小鼠四肢保持运动。如果小鼠漂浮在水面,四肢不动,可用木棒在其附近搅动。

5)不同批的小鼠因饲养环境、季节等原因的变化,体质上会出现差异。因此应采用同一批动物同时进行实验。

3. 后肢撑力实验

(1)目的:通过测定大鼠后肢肌力的变化,观察大鼠给予周围神经毒物后后肢运动神经损伤情况。

(2)原理:在正常情况下,当大鼠由一定高度落下时,可通过神经调节使其着地时双侧后肢内收而轻轻的着地;但当用周围神经毒物给大鼠染毒后,可损伤大鼠的周围神经,因此,支配后肢运动的神经受损,在从一定高度落下时双侧后肢内收不好,而导致着地时双侧后肢爪间滑开的距离增大,严重时可导致后肢瘫痪,从高空落下时后肢不能支撑。

(3)试剂与器材:大鼠,蓝墨水、棉棒、格尺、白纸

(4)操作步骤

1)实验前,在操作平台上平铺一张白纸,用于显示大、小鼠双侧后肢爪尖滑开的距离。

2)轻轻抓住大鼠的背部,用棉棒蘸取蓝墨水均匀涂于大鼠的双侧后脚掌,然后使其处于水平方位,距离下方光滑着陆平面约 30cm。

3)松手让大鼠自由落下,准确观察其着地时双侧后肢爪间滑开的最远距离,准确量取并记录该两点间的距离。

4)每只大鼠测定 3 次,取其平均值作为记录值,每次间隔 30min 以上。每 2 周测定一次。

(5)结果分析与评价:根据对照组和处理组的平均数进行统计分析。

(6)注意事项

1)每次实验时抓取部位应相同。

2)每次实验时均应准确量取其着地时双侧后肢爪间滑开的最远距离。

3)每次实验应间隔 30min 以上,避免遗留效应。

(三)痛觉测定

痛觉测定主要用于了解毒物对中枢神经系统的兴奋和抑制或麻醉作用的程度,也可揭示某些毒物(如二硫化碳)引起周围神经炎而使某些区域的皮肤痛觉过敏、减退或消失,以观察毒物对周围神经损害的程度。

痛觉测定方法甚多,比较常用的有小鼠"热板"法、大鼠鼠尾热刺激法、兔扬爪和缩肢反应测定法等,此外还有化学、机械和电刺激方法,均引起实验动物对疼痛的反应。根据刺激强度、反应时间、反应强度三个指标来分析痛觉程度。

1. 智能热板仪法

(1)目的:通过测定比较正常对照组和染毒组的鼠的舔爪时间,用以反映神经毒物对大、小鼠的周围神经系统的损伤情况。

(2)原理:正常鼠在受到高温烫脚爪时,经过一定时间后可出现舔爪现象;但当用周围神经毒物给大、小鼠染毒后,可损伤大、小鼠的周围神经,使热感觉传导减慢或热感觉过敏。因此,通过测定比较正常对照组和染毒组的鼠的舔爪时间,可以反映神经毒物对周围神经系统的损伤情况。

(3)试剂与器材:YLS—6A 智能热板仪。

(4)操作步骤

1)开机:用电源线将仪器与规定的电源连接,打开后面板上的电源开关,时间显示屏显示"0 0.",温度显示屏显示当前环境温度并开始向原始设定温度升温,仪器进入了正常的工作准备状态。

2)温度设定:按动一下升温和降温按钮,温度显示屏内的数字闪动进入温度设定程序,这时可再按动升温和降温按钮调整到试验要求的温度。每按一下,调整 0.1℃,当按住升温或降温按钮超过 2s,温度调整将进入快速调整,松开手后自动停止。设定完成后显示窗内数字闪动 5s 后自动换成显示当前温度。大鼠应设定为 52℃±0.2℃,小鼠应设定为 55℃±0.2℃。

3)升温:温度设定好后自动进入升温阶段,温度到达设定值时,无需等待稳定时间即可进入试验阶段。在升温过程中如需查看设定温度只需按动一下升温或降温按钮。

4)自动打印：采用随测打印。打印机处于联机状态，试验准备好后，按一下分组键G，时间显示屏上显示OK(OH)3s后消失，按住面板上的打印键P 3s以上，打印机指示灯闪动。随后每测一只动物，打印机就按序号打印出一个记时时间，直到一组测试完成，下一组测试之前再按一次分组键打印机又将打印另一组。

5)测量：用右手拿桶盖，左手轻轻抓住大小鼠背部，在将大小鼠放入桶内的同时用脚踏一下脚踏开关开始记时，同时用右手盖上桶盖，避免大小鼠因受热而从桶内蹦出。此时，应密切观察大小鼠的活动，如果出现大小鼠因脚爪受热而舔爪现象或用力挣扎，立刻用脚踏一下开关，并即时开盖取出大小鼠，避免不必要的烫伤。此时时间显示停止，并锁定数据，同时在打印机中打印输出(并带有序号)。再次测量按动开关又从零开始记时。周而复始。

(5)结果分析与评价：若染毒组舔足时间与对照组相比有显著性差异，表明毒物对痛觉功能有影响。

(6)注意事项

1)热板仪的整板表面虽经过处理有一定的硬度，但也不可用过硬的物品刮擦，避免损坏。

2)清理鼠粪尿时不要大量用水冲洗避免渗漏到仪器内部造成损害。

3)仪器用完后应及时关闭电源，清理干净放到通风干燥处，避免砸碰等硬性损伤。

2. 压痛实验

(1)目的：通过压痛实验判断动物神经系统受损趋势。

(2)原理：引起动物痛疼反应的压力称为痛阈，实验动物神经系统受损后其痛阈会改变，通过对不同时期不同实验组间动物痛阈的变化进行比较，可以推断不同实验状态下动物神经系统的受损趋势。

(3)试剂与器材：XZC-A型压痛仪。

(4)操作步骤

1)按仪器使用说明书准备好压痛仪。

2)用相应的方式将动物固定好，并将被测肢体部位放入压体棒与底座之间(尽量保持其不挣扎，需要训练、技巧和经验)。

3)踏脚踏开关，电机转动指针向右移动，压增加。

4)当动物出现痛疼挣扎(不是逃脱挣扎)时即松开踏板。指针指的刻度乘以10就是动物的痛阈(如果加上100g砝码就应乘以20)。

5)每只动物测三次取其平均值，每次间隔应在30min以上，每两周测一次。

(5)结果分析与评价：将每次测得的平均值作为原始数据输入Excel数据表中，求均数及标准差，并根据需要进行两组或多组间均数比较，以判断不同实验状态下动物神经系统的受损趋势。

(6)注意事项

1)根据实验需要安装不同的压体棒，锥型用来压足跖，扁型用来压尾。

2)压体棒与底座之间的空间应调节到与被压部位厚度相等。

3)测定时间应固定在一天的同一时间，并且尽量保证压迫位点相同以保持可比性。

4)测定部位不同，动物固定方法不同。大鼠压跖法：用双手将大鼠固定，将一后足放

在压体棒与底座之间。大鼠压尾法：持鼠方法同上，用扁头压大鼠尾1 3处。小鼠压尾法：左手住小鼠颈部皮肤，将其固定，右手拉住鼠尾送至压体棒与底座之间，用扁头压其尾根1cm处。

5)持鼠时尽量保持其不挣扎，这需要训练、技巧和经验。

6)正确判断逃脱挣扎和疼痛挣扎，以取得正确数据。

7)实验动物的品种、年龄、大小不同，平均痛阈可能会有较大差别，应在相同条件下进行对照实验以取得正确数据。

（谢克勤）

第八章

呼吸毒理学研究方法

第一节 肺功能测定

（一）目的

肺功能测定是测定肺的通气和换气等功能的一种技术。测定肺功能可以了解呼吸系统在外源化学物作用下的功能改变、损伤情况以及损伤的转归。

（二）原理

肺脏通过呼吸运动使外界空气进入肺，肺内气体排出体外，此为肺的通气功能；肺泡与血液之间 O_2 和 CO_2 的交换称为肺的换气功能。外源化学物对呼吸系统产生的损害可影响到肺的通气和换气功能，从而表现为相应肺功能指标的变化。

（三）肺功能测定的项目、指标

肺功能测定可分为通气功能测定和换气功能测定两类。

1. 通气功能测定　包括静态肺容量测验、动态肺容量测验、呼吸机械动力测验和肺泡气体分布测验。动态肺容量测验又包括普通肺通气功能测验和小气道功能测验。

2. 换气功能测定　包括弥散功能测验和动脉血液气体分析。

肺功能测定项目中都包括数量不等的指标，连同所需测定仪器，见表 8-1。

表 8-1　肺功能测验项目、主要指标和仪器

测验项目	主要指标	测定仪器
静态肺容量测验	肺活量（VC）	肺量计
	残气量（RV）	肺量计和气体分析仪
	肺总量（TLC）	肺量计和气体分析仪
动态肺容量测验	静息通气量	肺量计
	最大自主通气量（MVV）	肺量计
	用力肺活量（FVC）	肺量计
	第一秒用力呼气量（FEV_1）	肺量计
	最大呼气中期流速（MMFR）	肺量计
	最大呼气流速（PEFR）	Wright 最大呼气流速计

续表

测验项目	主要指标	测定仪器
小气道功能测定	闭合气量(CV)	肺量计、呼吸记录仪、氮气计
	最大呼气流速-容量曲线(MEFV)	流速容量记录仪
	等流速容量曲线($V_{iso}V$)	流速容量记录仪
	动态肺顺应性(Cdyn)	体积描计密闭室等
肺泡气体分布测定		肺量计
肺弥漫功能测定	一氧化碳弥散量(DLCO)	肺量计、气体分析仪等
动脉血液气体分析	动脉血氧分压(PaO_2)、动脉血二氧化碳分压($PaCO_2$)、动脉血pH	血液气体分析仪

(四) 仪器与器材

1. FJD-80 单筒肺量计

2. 肺量计

(五) 操作步骤

具体操作参见有关仪器说明书及其他专业书籍。

第二节 在体 BAL 与 BALF 分析

(一) 目的

1. 学习掌握支气管肺泡灌洗(bronchoalveolar lavage，BAL)的实验方法。

2. 掌握对支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid，BALF)的分析。

(二) 原理

支气管肺泡灌洗(BAL)能直接获取肺内炎症免疫效应细胞，是探讨肺局部免疫病理过程的一种比较安全和有用的检查方法。通过对支气管肺泡灌洗液(BALF)中细胞计数和分类，以及对生化指标的检测和分析，可以为某些肺疾病，特别是弥漫性间质性肺疾病、肺部肿瘤以及免疫受损患者的肺部感染等提供辅助性临床诊断和判断预后。在毒理学实验中可建立动物肺部疾患的模型，通过对 BALF 分析来为临床疾病提供诊断和治疗依据。也可应用本方法研究外来化合物对支气管、肺组织的损伤情况或程度。

(三) 试剂与器材

1. 器材　气管插管，手术用剪刀、镊子，塑料离心管，离心机，载玻片，光学显微镜，荧光显微镜，4℃冰箱，低温冰箱，血细胞计数板，微量加样器，CO_2 培养箱。

2. 试剂　1%戊巴比妥钠，生理盐水，Hank's 液，10%小牛血清，RPMI1640 培养液，单克隆抗体 CD_3、CD_4、CD_8，羊抗鼠荧光抗体。

(四) 操作步骤

1. BAL

(1)动物及染毒：选用成年大鼠、豚鼠或家兔，根据实验设计要求进行染毒。

(2)BAL 过程

1)麻醉:用1%戊巴比妥钠对实验动物行腹腔注射麻醉。

2)气管插管、灌洗:将动物固定在解剖板上,开胸,气管插管,用10ml无菌生理盐水注入气管肺组织内,反复抽吸3次。灌洗液回收后以层无菌纱布过滤,记录回收量。

3)BALF保存:收集到的BALF应立即放入冰水中保存备查。

2. BALF分析

(1)BALF细胞总数和分类计数

1)将上述回收灌注液装入塑料离心管中,在4℃下以1200r/min离心10min,取上清(原液或10倍浓缩)-70℃保存,用做可溶性成分检测。

2)经离心沉淀的细胞成分用Hank's液(不含Mg^{2+}、Ca^{2+})在同样条件下离心2次,每次5min。弃去上清后加Hank's液3~5ml制成细胞悬液,也可以应用灌洗原液以减少细胞丢失。

3)在血细胞计数板上计数BALF中细胞总数,一般以1×10^9/L表示。如果细胞数过高可再用Hank's液稀释,调整细胞数为5×10^9/L,并同时将试管浸入碎冰块中备用。

4)细胞分类计数:采用细胞离心涂片装置,加入备用细胞悬液(细胞浓度为5×10^9/L)100μl,在4℃下以1200r/min离心10min,通过离心作用将一定数量的BALF细胞直接平铺在载玻片上。取下载玻片后立即冷风吹干,置无水乙醇中固定30min后,进行染色,一般用Wright或HE染色。

5)40倍光学显微镜下计数200个细胞,进行细胞分类计数。

(2)BALF中T细胞亚群的检测

1)采用间接免疫荧光法,将上述获得的BALF细胞成分,用含10%小牛血清RPIM1640培养液3~5ml制成细胞悬液。

2)将细胞悬液倒入平皿中,置于37℃ 5% CO_2培养箱中孵育2h,进行贴壁处理,去除肺泡巨噬细胞。

3)取出细胞悬液,再用Hanks液冲洗离心1次,弃去上清留20~100μl。经贴壁处理后的细胞悬液中,肺泡巨噬细胞显著减少,淋巴细胞相对增多。

4)将经贴壁处理的细胞悬液分装3小锥型离心管内,每管20~30μl,用微量加样器向标本中各加入单克隆抗体CD_3、CD_4、CD_8各20~40μl,混匀后置于4℃冰箱中作用1~2h。

5)取出标本,先用Hanks液冲洗离心2次,以12000r/min离心20s,然后加羊抗鼠荧光抗体各20~40μl,置于4℃冰箱中作用30min。

6)取出标本用Hanks液以同样速度和时间离心冲洗2次,弃上清留20μl充分混匀细胞,取1滴于载玻片上。荧光显微镜下数200个淋巴细胞并计算出标有荧光细胞的阳性率。

(3)其他指标的检测:可对BALF中的非细胞成分如蛋白质、免疫球蛋白、脂类等进行测定,具体方法见有关参考书。

(五)结果分析与评价

实验组和对照组动物的各指标进行比较,看两组动物之间是否具有统计学意义的差异。

(六)注意事项

1. 在进行 BAL 时，应防止大气道分泌物混入和灌洗液外溢，保证 BALF 的回收量。

2. 在灌洗过程中要应充分抑制实验动物咳嗽，否则容易引起支气管壁粘膜损伤而造成灌洗液的混血，同时影响回收量。

3. 一份合格的 BALF 标本应是：BALF 中没有大气道分泌物混入；回收率＞40%，存活细胞占 95%以上；红细胞＜10%，上皮细胞＜3%～5%；涂片细胞形态完整、无变形，分布均匀。

第三节 体外 IPL 与分析

（一）目的

1. 掌握肺的分离与保存方法。

2. 掌握离体肺灌注（isolated perfused lungs，IPL）的方法。

3. 掌握对离体肺灌注的灌注液的分析。

（二）原理

在呼吸机的维持下，将实验动物肺脏分离出来，在特殊的保护液中保存，使其仍具备活力。在一定时间后，注入同一动物的自体血液或添加同种异体动物血液（或灌注液）。此方法用以研究在体外情况下，对肺脏保护、灌注和灌注液成分进行分析。

（三）试剂与器材

1. 器材　微型人工呼吸机，手术用器械，恒流泵。

2. 试剂　硫喷妥钠，肝素，生理盐水，Euro Collins 保护液。其主要成分如下（表 8 2）：

表 8 2　Euro-Collins 保护液成分（mmol/l）

成分	EC 液
Na^+	10
K^+	115
Cl^-	15
HCO_3^-	10
Mg^{2+}	0
PO_4^{3-}	58
pH	7.3
葡萄糖（g/L）	35
右旋糖酐（g/L）	0
胰岛素（U/L）	0

（四）操作步骤

1. IPL 过程

（1）实验动物：家兔，体重（2.0±0.3）kg。

(2)麻醉：家兔以硫喷妥钠 25mg/kg 经耳缘静脉注入麻醉。

(3)离体肺的获取

1)家兔麻醉后，气管切开，微型人工呼吸机控制呼吸，潮气量 15ml/kg，频率 45 次/min，FiO_2(吸入氧气分数)21%。

2)胸正中切口锯开胸骨，右心耳注入肝素 700 U/kg，右房插管收集自体血，用生理盐水稀释至 HCT(红细胞比容)25%，(以备再灌注用)。

3)心脏停跳时，经主肺动脉灌入 4℃保护液冲洗肺脏，同时切开左心耳，灌注压 2.94kPa(30cm H_2O)，直至左房引流液澄清为止。

4)完整切除心肺，在肺膨胀 50%后浸入 10℃与灌洗液相同的保护液中保存。

(4)离体肺的再灌注

1)离体肺经保存后支气管插管接呼吸机(潮气量 25ml/kg，频率 45 次/min，FiO_2 21%)。

2)用恒流泵将 30℃自体血以 20ml/min 泵入肺动脉。

2. 分析

(1)10min 后测定肺静脉回血的血气分析。

(2)30min 后测定气道压力，平均肺动脉压，肺湿重(Wr)，并将肺置入 80℃烤箱烘干后称重(Wd)。

(3)可对肺灌洗液进行各种分析。

(五) 结果分析与评价

将实验组和对照组动物的各指标进行比较，看两组动物之间是否具有统计学意义的差异。

(六) 注意事项

1. 严格控制呼吸机的条件，防止过快或过慢。

2. 离体肺的保存时间在 4～6h 之间，不要在保护液中放置过久。

第四节　胎鼠肺细胞原代培养与上皮细胞纯化

(一) 目的

1. 掌握体外肺细胞原代培养和传代培养技术。

2. 掌握细胞毒性实验方法。

(二) 原理

本节主要介绍肺上皮细胞的原代培养与传代培养。原代培养即从供体取组织的首次培养。其优点是：组织细胞刚离体，生物学性状未发生变化，最能反映体内的状态。

(三) 试剂与器材

1. 出生后 2～3 天的金仓鼠乳鼠。

2. 手术用剪刀、镊子等。

3. 器材为细胞培养所需的常规设备与器材。

(四) 操作步骤

1. 在无菌条件下解剖乳鼠，取出肺组织。

2. 胎鼠肺组织经 Hanks 液清洗 2 次后，剪切成细小碎块（约 1mm³），再用 Hanks 液清洗，离心，去掉红细胞。

3. 组织块中加 1.25g/L 胰蛋白酶（1ml/肺）和 0.02g/L DNA 酶，少许（即 10～20ml 消化液中加 100μl），置 37℃水浴中 15min 后，大部分组织被消化为细胞悬液。立即移去，剩余组织加同样量的新鲜消化液再进行消化（步骤同上）。细胞悬液中，立即加入同样消化液量相等的培养液 MEM 和终浓度为 100ml/L 的 FCS，以停止消化。

4. 用尼龙网（H.Ter，Hc3 100）过滤细胞悬液，滤除组织块，于 4℃离心（1500r/min）5min，沉淀即为总细胞（含上皮细胞和成纤维细胞）。可再离心一次，弃去上清液。

5. 加 35ml 培养液 MEM 于细胞中，离心（800r/min）3min，其上清液中大多数为成纤维细胞，沉淀中大多数为上皮细胞。此为初次的细胞，将其保存在冰水浴中。

6. 将初次分离的成纤维细胞悬液（35ml）于 4℃离心（1500r/min）5min，弃去上清。于细胞中加培养液 MEM 和 100ml/LFCS（终浓度）混匀成细胞悬液（约 4～5 个胎鼠肺细胞需 10～15ml 培养液）。置入 75cm² 的培养瓶中，每瓶加细胞悬液 12～15ml。置于 37℃ 50ml/L CO_2 培养箱中培养 1h（每 15min 取培养瓶，于倒置显微镜下检查细胞的贴壁情况）。瓶底贴壁的细胞，即为纯化的成纤维细胞，可加新鲜培养液（量同上）后，再加入培养瓶中于 37℃培养 1h。贴壁的细胞大部分为成纤维细胞，少数为上皮细胞；而含悬浮细胞的培养液中则大部分为上皮细胞。

7. 将初次分离的上皮细胞沉淀（参照步骤 6）加入 1g/L 胶原酶溶液 15ml（10g/L 胶原酶 1.5ml 和 MEM13.5ml），混匀，于 37℃搅动培养 15min，再加入等量的培养液 MEM 和 100ml/LFCS（终浓度）灭活，离心（1500r/min）5min，收集所有的细胞。

8. 再贴壁方法同步骤 6。成纤维细胞因贴于瓶底而被除去，培养瓶中悬浮的大部分细胞为上皮细胞。

9. 将步骤 6 和步骤 8 所获悬浮的细胞离心（1500r/min）5min，弃去上清，加培养液 MEM 35ml，混匀，离心（800r/min）3min，重复 3 次，所获细胞即为纯的上皮细胞。将纯的上皮细胞加 10～15ml MEM 培养液和 100ml/L FCS（终浓度）培养（条件同上）过夜，即可贴壁，观察其形态和纯度。长满瓶底的细胞数为 1×10^6/cm²～75×10^6/瓶。

10. 液氮冻存保种。

（五）注意事项

1. 应严格无菌操作。

2. 胎鼠、胎肺在 Hanks 液的剪切，均应置于冰水中，或在冰块上进行。

3. 每步操作尽量不丢弃细胞，一定要在离心后上清液中极少的情况下方可弃去。

（钟才高）

第九章

肝脏毒理学研究方法

第一节　肝损害的体内评价方法

一、血清酶活性测定

(一) 丙氨酸氨基转换酶(ALT)活性测定——比色法

1. 原理　ALT 在适宜的温度与 pH 条件下催化丙氨酸与 α 酮戊二酸生成谷氨酸与丙酮酸，反应至所规定时间后加 2,4 二硝基苯肼-盐酸溶液终止反应，同时 2,4 二硝基苯肼与丙酮酸中羰基加成，生成丙酮酸苯腙。苯腙在碱性条件下呈棕红色，根据颜色深浅比色定量，计算 ALT 活性强度。

2. 试剂与器材

(1)0.1mol L 磷酸盐缓冲液(pH7.4)：精确称取磷酸氢二钠($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$，AR)11.928g，磷酸二氢钾(KH_2PO_4，AR)2.176g，加少量蒸馏水溶解并稀释至 1000ml。

(2)ALT 底物液：称取 DL 丙氨酸 1.79g，α 酮戊二酸 29.2mg 于烧瓶中，加 0.1mol L 磷酸盐缓冲液(pH7.4)约 90ml 煮沸溶解后，待冷，用 1mol L NaOH 溶液调 pH7.4(约加 0.5ml)，转至 100ml 容量瓶中，再加磷酸盐缓冲液调至 100ml，混匀。加氯仿数滴防腐，贮于冰箱内，可保存 1 个月。

(3)2,4-二硝基苯肼溶液(显色剂)：称取 2,4 二硝基苯 19.8mg，用 10mol/L 盐酸 10ml 溶解后，加蒸馏水至 100mL，保存于棕色瓶中备用，此液于冰箱中可保存 3 个月。

(4)0.4mol L 氢氧化钠溶液：精确称取 16g NaOH，溶于 1000ml 蒸馏水中，摇匀。

(5)丙酮酸标准溶液(2μmol ml)：精确称取纯丙酮酸钠 22.0mg 于 100ml 容量瓶中，加 0.1mol L 磷酸盐缓冲液至刻度，临用前配制。

(6)器材：注射器、离心机、圆底离心管、吸管(1ml、5ml、10ml)、量筒(100ml、1000ml)、容量瓶(100ml、1000ml)、电子天平(感量 0.1mg、1mg)、具塞比色管、722 分光光度计、比色皿等。

3. 操作步骤

(1)标准曲线绘制：取 1 支 10ml 干净具塞比色管(对照管)，加 ALT 底物液 0.50ml。另取 4 支 10ml 干净具塞比色管，分别依序加入丙酮酸标准溶液(2μmol ml)0.05、0.10、0.15、0.2、 ml，ALT 底物液 0.45、0.40、0.35、0.30ml。以上 5 管各加 0.1mol L 磷酸盐缓冲液(pH7.4)0.10ml，此时分别相当于 ALT 活力单位(U L)0、28、57、97、150，摇匀。

置37℃水浴5min后，各管加2,4-二硝基苯肼溶液0.5ml，混匀，置37℃水浴20min后，各管加0.4mol/L氢氧化钠溶液5.0ml，混匀，10min后，以蒸馏水调零点，用500nm波长比色，读取各管吸光度数值。各标准管吸光度减去对照管吸光度，以各标准管对应的ALT活力单位为横坐标，以相应的吸光度值为纵坐标绘制标准曲线。

(2)样品测定：取2支干净比色管，1支为样品管，1支为样品对照管。于样品管中加入0.1ml待测血清样品和0.5ml ALT底物液，样品对照管仅加0.1ml待测血清样品，置37℃水浴30min后，样品管加0.5ml 2,4-二硝基苯肼溶液，样品对照管加0.5ml 2,4-二硝基苯肼溶液和0.5ml ALT底物液。置37℃水浴20min后，两管各加5ml 0.4mol/L氢氧化钠溶液，摇匀，10min后以蒸馏水调零点，用500nm波长比色，读取2管吸光度数值。

4. 结果计算与评价　样品管吸光度减去样品对照管吸光度后，查标准曲线得ALT活力单位。由于肝组织中所含的ALT浓度最高，肝损伤时，ALT释放到血液中，使血清ALT活力单位增加。一般说来，血清ALT活力单位增加越高，肝细胞损害的程度越大。

5. 注意事项

(1)测定结果超过150U时，应将血清稀释后再测定，结果乘以稀释倍数。

(2)血清中的ALT在室温(25℃)可保存2天，在冰箱(0℃～4℃)可保存1周，冰冻(-25℃)可保存1个月。

(3)一般在急性病毒性肝炎期、化学性肝细胞坏死时ALT明显增高；肝癌、肝硬化、慢性肝炎，ALT中度增高；阻塞黄疸、胆管炎可轻度增高。但ALT升高也可见于肝外疾病，此时应多方面分析，综合考虑。

(二) 鸟氨酸氨基甲酰转移酶(OCT)测定——比色法

1. 原理　血清OCT作用于瓜氨酸，在砷酸盐存在下，释放氨，氨在酚-硝基氢氰酸钠和碱性次氯酸钠作用下产生蓝色的靛酚化合物，瓜氨酸释放氨的量与OCT成正比，根据颜色深浅比色确定OCT活力强度。

2. 试剂与器材

(1)瓜氨酸-砷酸钠试剂：称取DL-瓜氨酸3.5g，砷酸氢二钠($Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$)15.6g，溶解于90ml蒸馏水中，调pH至7.1，用蒸馏水定容至100ml。

(2)酚-硝基氢氰酸钠试剂：称取酚10.0g，硝基氢氰酸钠50mg，溶解于蒸馏水，并定容至400ml，在棕色瓶中，贮存于4℃冰箱。

(3)碱性次氯酸钠溶液：称取氢氧化钠5.0g，溶于约200ml蒸馏水中，加6ml次氯酸钠(含氯量为10%～14%)。用蒸馏水定容至400ml，在棕色瓶中，贮存于4℃冰箱。

(4)氨标准溶液贮存液：精确称取464mg硫酸铵[$(NH_4)_2SO_4$]溶于约600ml蒸馏水中，加2ml浓硫酸，摇匀，再用蒸馏水定容至1000ml。贮存于4℃冰箱。

(5)1.4μmol/ml氨标准溶液：精确量取上述氨标准溶液贮存液10ml，用蒸馏水稀释定容至50ml。临用前配制。

(6)器材：具塞比色管、吸管(1ml、5ml、10ml)、量筒(100ml、500ml、1000ml)、容量瓶(50ml、100ml、1000ml)、电子天平(感量0.1mg、1mg)、722分光光度计、比色皿等。

3. 操作步骤

(1)取2支10ml干净比色管，1支为样品管(S_m)，1支为对照管(C)，其中C管用于测定血浆内源性氨。

(2)在上述 S_m、C 两管中各加血浆样品 0.5ml。

(3)于 S_m 管中加 0.5ml 瓜氨酸-砷酸盐试剂,摇匀。将 S_m、C 两管管盖盖紧。

(4)将 S_m、C 两管于 37℃ 培养 24h。

(5)培养结束后,于 C 管中加 0.5ml 瓜氨酸-砷酸盐试剂,摇匀。

(6)从以上两管中各精确吸取 0.05ml,分别放入对应的已编 S_m、C 管号的另外两支 10ml 干净比色管中。

(7)另取 2 支 10ml 干净比色管,1 支为空白管(B),1 支为标准管(S_t),B 管加 0.05ml 蒸馏水,S_t 管加 0.05ml 1.4μmol/ml 氨标准应用液。

(8)在样品管(S_m)、对照管(C)、空白管(B)、标准管(S_t)中,各加 2.0ml 酚-硝基氢氰酸钠试剂,摇匀。再各加 2.0ml 碱性次氯酸钠溶液,摇匀。在 37℃ 培养 15min。

(9)培养后以蒸馏水调零点,用 630nm 波长比色,读取上述 4 管吸光度数值。

4. 结果计算与评价

(1)结果计算:OCT(国际单位,IU/L) $=\dfrac{S_m-C}{S_t-B}\times 1.94$

式中:S_m:样品管吸光度;

C:对照管吸光度;

S_t:标准管吸光度;

B:空白管吸光度;

1.94:OCT 活性国际单位转换系数。

(2)结果评价:OCT 存在于肝细胞线粒体中,急性肝细胞损害时,血清中 OCT 活力明显增加。肝癌时 OCT 也明显增加。慢性肝炎和肝硬化活动期可有轻度增加。有人认为检测 OCT 评价肝损害比 GOT 或 ALP 敏感。

5. 注意事项

(1)OCT 活力单位是用国际单位表示。1 个 OCT 活力单位是指每 1L 血浆中 OCT 每分钟催化 1μmol 瓜氨酸转变成鸟氨酸。

(2)采用 OCT 作为评价化学性肝损伤的检测指标时,受试动物宜选用大鼠进行试验。

二、肝脏排泄功能测定

(一)磺溴酞钠滞留试验

1. 原理 给受试动物注射磺溴酞钠(bromsulphalein,BSP)后,除一小部分被肝脏 Kupffer 细胞或其他组织所破坏外,大部分被肝实质性细胞所摄取,继之经胆汁排出体外。如肝细胞被损害时,肝脏排泄 BSP 减慢,而大部分潴留在血液中。血浆中 BSP 在碱性条件下变成带紫红色的醌氏盐结构,其颜色深浅与 BSP 潴留量多少呈正比。根据比色定量,求出血浆 BSP 潴留百分率。再与对照组动物血浆 BSP 比较,可判断受试动物肝脏损害程度。

2. 试剂与器材

(1)10mg/ml BSP 溶液:BSP 一般采用封于安瓿内的无菌溶液,如室温太低,可有 BSP 结晶析出时,则应在温水中使其溶解,并混匀,然后用 0.9%NaCl 溶液稀释至所需浓

度。

(2)酸性氯化钠溶液:95ml 0.9% NaCl溶液加5ml 10% HCl溶液。

(3)碱性氯化钠溶液:95ml 0.9% NaCl溶液加5ml 10% NaOH溶液。

(4)5mg/100ml BSP标准应用液:精确吸取5ml 10mg/ml BSP溶液用0.9%NaCl溶解定容至1000ml。

(5)器材:小塑料离心管(1.5ml)、注射器(1ml)、移液器(200μl)、具塞比色管、吸管(1ml、5ml)、量筒(100ml)、容量瓶(100ml、500ml)、电子天平(感量0.1mg、1mg)、离心机、722分光光度计、比色皿等。

3. 操作步骤

(1)以100mg/kg剂量给小鼠尾静脉注射浓度为10mg/ml的BSP注射液。小鼠尾静脉注射量一般为0.10ml/10g体重,20g小鼠注射1.mg/ml BSP注射液0.2ml。

(2)用乙醚轻度麻醉受试小鼠,注射BSP3 min后,从(眼)眶动脉采集血液样品。血液样品置于含1mg草酸钠的1.5ml塑料离心管中。

(3)离心分离血浆,以速度为1000r/min,离心5min。

(4)按下表步骤操作:

试管编号	样品管(X)	样品对照管(C)	标准管1(S_1)	标准管2(S_2)	空白管(B)
血浆样品(ml)	0.5	0.5	—		
0.9%NaCl(ml)	0.5	0.5	0.9	0.8	1.0
BSP标准应用液(ml)			0.1	0.2	
酸性氯化钠液(ml)		5.0		—	
碱性氯化钠液(ml)	5.0		5.0	5.0	5.0
相当于血浆潴留BSP%			5%	10%	

摇匀后,用580nm波长比色,以空白管调零点,读取标准管吸光度和样品管吸光度;然后将样品管内液体倒入样品对照管内,摇匀,读取样品对照管吸光度。

4. 结果计算与评价

(1)结果计算:

$$\text{血浆}\ BSP\% = \frac{\text{样品管吸光度}-\text{样品对照管吸光度}}{\text{标准管吸光度}} \times \text{相当于标准管}\ BSP\%$$

(2)结果评价:肝脏功能损伤时如肝脏实质性损害、肝硬化、胆汁瘀积、原发性肝癌等,BSP在体内潴留时间延长,在选定的检测时间内,BSP潴留量百分率增加。通过化学性肝损伤动物模型比较受试动物和正常动物血浆中BSP潴留量百分率可以评价受试动物肝脏损害程度。

5. 注意事项

(1)不同种类的受试动物其清除BSP的速率不同,其BSP剂量应以正常动物给药30min后在体内残留2%~3%为宜。因此,不同种类动物其给药剂量不同。

(2)BSP潴留试验不能鉴别肝脏实质性和阻塞性之间引起的功能损害。

(3)正常人每公斤体重注射5mg BSP时，注射后30min血浆中BSP潴留量应<10%；45min后<6%；注射1h后血浆中BSP已完全被清除。

(二) 靛青绿排泄试验

1. 原理　靛青绿(indocyanine green，ICG)，也叫吲哚氰绿，为无毒染料。ICG从静脉注入机体后在血液中与血浆蛋白结合而迅速转运到肝细胞，被肝细胞摄取排泄。在肝脏中ICG不和谷胱甘肽结合，无肠肝循环，也不从肾脏排泄而直接由胆道排至肠道，所以它是一种仅从胆道排泄的诊断性色素。当肝脏受到损害时，肝脏排泄ICG的功能降低，从而影响血液中ICG的清除，致使血液中ICG滞留率增加，通过测定血中ICG的浓度可求出滞留率。在实验性肝脏损害的功能检查方面，目前是最有价值，最实用的方法。

2. 试剂与器材

(1)ICG注射液：常用Diagnogreen(日本产、商品名)，每支25mg，用生理盐水精确定容至5ml，浓度为5mg/ml。

(2)生理盐水。

(3)脱色剂：次氯酸钠(NaOCl)，用蒸馏水稀释2倍。

(4)10mg/L ICG标准液：精确量取5mg/ml ICG注射液1ml，加蒸馏水稀释至500ml。

(5)器材：注射器(5ml)、离心管、具塞比色管(5ml)、吸管(1、5ml)、量筒(50ml、100ml、500ml)、容量瓶(10ml、50ml)、电子天平(感量0.1mg、1mg)、离心机、分光光度计、比色皿、动物固定架等。

3. 操作步骤

(1)实验动物选用家犬(最好为比格尔犬)，按2.0mg/kg体重剂量从受试动物前肢内侧头静脉或后肢外侧小隐静脉注射5mg/ml ICG注射液，注射量因动物体重而定，如10kg动物，注射4ml。

(2)注射后准确记录时间，15min整，从ICG注射对侧肢静脉取血4ml左右，分离血清，注意不可溶血。

(3)取血清1ml加生理盐水2ml混合，比色，波长805nm，以蒸馏水校正"0"点，读取吸光度为A_1。然后加入脱色剂1滴，混合后立即比色，读取吸光度为A_2。A_1-A_2为血清ICG的吸光度，查标准曲线得出ICG的浓度。

(4)取具塞比色管若干编号，按下表操作，绘制标准曲线：

试管编号	空白管	标1	标2	标3	标4	标5	标6
10mg/L ICG标准液(ml)	-	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
蒸馏水(ml)	1.0	0.9	0.8	0.6	0.4	0.2	
正常动物混合血清(ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
生理盐水(ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
相当于ICG浓度(mg/L)		1	2	4	6	8	10

混匀，用波长805nm比色，B管调零，读取各管的吸光度，并绘制标准曲线。

4. 结果计算与评价

(1)ICG 注射后 15min 滞留率(R_{15ICG})%。

$$= \frac{ICG注射后15min浓度(mg/L)}{ICG注射后零时间浓度(mg/L)} \times 100\%$$

(2)ICG 血液中消除率(K_{ICG}):在注射后 5、10、15、20min 分别抽取血液,用分光光度计测定每份血标本中 ICG 浓度(C_5、C_{10}、C_{15}、C_{20}),以各浓度的对数值为纵轴、时间为横轴在半对数坐标纸上作图,根据 logC 和时间(T)绘制回归线。交于纵轴点为 $logC_0$,查 $logC_0$ 的反对数得 C_0,再求 $1/2C_0$,取 $log1/2C_0$,在纵轴上得 $log1/2C_0$ 点,通过此点作横轴平行线,交于回归线,过交点作纵轴平行线交于横轴,与横轴的交点即为血中 ICG 半衰期($T_{1/2}$),再按下列公式计算 ICG 血中消除率(K):消除率$(K)=\frac{0.693}{T_{1/2}}$

(3)结果评价:肝实质性损害时 R_{15ICG}(%)升高,K_{ICG}(%)降低,ICG 半衰期($T_{1/2}$)延长。

5. 注意事项

(1)不同给药剂量不同动物种类其 R_{15ICG}(%)、K_{ICG}(%)与 ICG 半衰期($T_{1/2}$)不同。有人报道,正常情况下,大鼠:ICG 剂量为 16mg/kg 体重时,其半衰期($T_{1/2}$)为 6.5min,K_{ICG}(%)11%;兔:ICG 剂量为 16mg/kg 体重时,其半衰期($T_{1/2}$)为 3.5min,K_{ICG}(%)20%;犬:ICG 剂量分别为 1mg/kg、2mg/kg、4mg/kg 体重时,其半衰期($T_{1/2}$)分别为 7min、17min、30min,K_{ICG}(%)分别为 10%、4%、2%。

正常人从静脉给予 ICG 0.5mg/kg 体重时,其 R_{15ICG}(%)为 0%~10%,随着年龄的增大,R_{15ICG}(%)稍增加,每增加 5 岁,R_{15ICG}(%)可增加 0.2%~0.6%。血中 K_{ICG}(%)一般为 16.8%~20.6%。

(2)本实验所取血液样品不能溶血,溶血影响实验结果。

三、肝脏分泌功能测定

胆汁酸(bile acids)是胆汁中的主要成分,是胆固醇经肝组织代谢的最终产物。肝细胞分泌两种初级胆汁酸:一种是 3α、7α、12α-三羟胆酸(CA)和 3α、7α-二羟胆酸(CDCA),这两种胆酸分别与甘氨酸、牛磺酸结合形成初级结合胆汁酸、甘氨鹅脱氧胆酸。这些初级胆酸随胆汁分泌排至肠道,参与脂肪转化,促进脂肪和胆固醇的消化和吸收。化学性肝损害时胆汁分泌发生障碍,血液中胆汁酸含量增加。目前测定血清胆汁酸的方法有:气液相色谱(GLC)、酶法、放射免疫分析法(RIA)、酶联免疫分析法(EIA)。下面介绍测定血清甘-胆酸的放射免疫分析法(RIA)。

(一)原理

血清甘-胆酸绝大部分是和蛋白质相结合而存在,向试验反应液中加一定量的 8-苯胺-1-萘磺酸(ANS)使结合的甘-胆酸解离成游离状态,然后与标记物 ^{125}I 组胺-甘-胆酸竞争性与抗体结合。通过测定抗原抗体沉淀物的放射性强度,从标准曲线直接查得血清中甘-胆酸的含量。

(二)试剂与器材

1. 缓冲液　取 0.2mol/L(pH7.4)PB 液 100ml,加 NaCl 8.5g,明胶 1g,NaN_3 1g,加

蒸馏水至 1000ml，于 37℃ 溶解后置 4℃ 冰箱中贮存。

2. 标准液　取正常混合动物血清，经乙醇提取法测定血清中的甘 胆酸浓度，然后向其中加入标准甘-胆酸或用 20g L 牛血清清蛋白(BSA)溶液稀释，使其浓度为 0.5、2.0、5.0、15、30μmol L。每瓶分装 0.25ml，冷冻干燥。4℃ 保存，临用前加 0.25ml 蒸馏水溶解。

3. 2g L δ 苯胺 1 萘磺酸(ANS)溶液　取 ANS 1g 溶于 500ml 缓冲液中。

4. 抗血清　制备方法如下：

(1)取甘 胆酸(Sigma 公司生产)50mg 溶于 2ml 吡啶中，加蒸馏水 8ml 为 A 液，置磁力搅拌器上搅拌溶解。另取牛血清清蛋白(BSA)100mg、碳二亚胺 20mg 溶于 1ml 蒸馏水中为 B 液。将 B 液立即滴加到 A 液中，调至 pH5.5。反应 4～6h 后补加碳二亚胺 15mg，4℃ 过夜。用蒸馏水透析 48h，冷冻干燥，即为免疫原。

(2)选用 4 个月龄新西兰兔，按照每支取免疫原 1mg 溶于 1.5ml 生理盐水中，加等量福氏完全佐剂乳化，按常规方法注射背部皮内多点，加强免疫每月一次，剂量 0.5mg 只，6 个月后颈动脉放血，滴度约 1：25 000 时分离血清，置 -20℃ 贮存。按可供测 100 管量分装，冻干，用前加缓冲液 5.5ml 溶解。

5. ^{125}I 组胺 甘 胆酸　制备方法如下：

(1)取甘-胆酸 18.6mg 溶于 0.8ml 吡啶中，为 A 液；取盐酸组胺 11.0mg、水溶性碳二亚胺 20mg 溶于 4ml 蒸馏水中为 B 液。将 A 液滴加到 B 液中。磁力搅拌 1h，放 4℃ 过夜。加 0.1mol L(pH7.4)的 PB 溶液至 10ml。用 5ml 正丁醇提取两次。两次提取液合并，4℃ 保存。提取液中含有组胺 甘 胆酸。

(2)取提取液 100μl，氮气吹干，加 0.25mol L(pH7.4)PB 溶液 50μl，置快速混匀器上 1min，使其充分溶解。再加入 Na^{125}I 37MBq(1m Ci)，氯胺 T 液 10μl(25μg)，反应 1～1.5min，即刻加偏重亚硫酸铵液 10μl(62.5μg)。将反应液点样于硅胶 G 薄板上，以正丁醇：冰醋酸：水(85：10：5)为展开剂。进行放射自显影定位。^{125}I 组胺 甘胆酸的 R_f 值约 0.3。将标记物刮下，用无水乙醇洗脱，分装 74kBq 100μl，于 4℃ 冰箱保存，用前加缓冲液 5.5ml。

6. PR 分离剂。

7. 器材　注射器(5ml)、塑料离心管(1.5ml)、具塞比色管(5ml)、吸管(15ml、5ml)、移液器(20μl、100μl、200μl、1000μl)、量筒(50ml、100ml、500ml)、容量瓶(100ml、500ml)、电子天平(感量 0.1mg、1mg)、离心机、冰箱、自动 γ-免疫计数仪、兔固定架等。

(三) 操作步骤

1. 取 10mm×75mm 塑料试管若干，按下表加入样品和试剂。

试管编号	空白管(B)	S_0 管	S_1 管	S_2 管	S_3 管	S_4 管	S_5 管	测定管
20g L BSA 液(μl)	20	20		—	-		—	—
标准液(μl)*		—	20	20	20	20	20	—
待测血清(μl)	—	—	—	-		—	-	20

续表

试管编号	空白管(B)	S_0 管	S_1 管	S_2 管	S_3 管	S_4 管	S_5 管	测定管
抗血清(μl)	—	200	200	200	200	200	200	200
^{125}I标记物(μl)	100	100	100	100	100	100	100	100
缓冲液(μl)	200							
混合,置37℃ 2h后,移至4℃ 1h。								
PR分离剂(μl)	500	500	500	500	500	500	500	500

注 S_1、S_2、S_3、S_4、S_5 管标准液的浓度分别为 0.5、2、[illegible]、1[illegible]、30μmol/L。

2. 加入 PR 分离剂后混合,放 37℃ 30min。离心 15min。弃去上清液,以空白管调零,测定各管沉淀物的放射性强度。

(四) 结果计算与评价

1. 结果计算　分别以 S_1、S_2、S_3、S_4、S_5 标准管放射性强度占 S_0 管百分率(%)对各管标准液浓度(μmol/L)绘制标准曲线,根据测定管放射性强度占 S_0 管百分率(%)从标准曲线上直接读出血清中甘胆酸浓度(μmol/L)。

2. 结果评价

(1)空腹血清甘胆酸:大量的结果表明,测定血清甘胆酸是检测急性病毒性肝炎以及急性化学性肝损害的一项灵敏指标,与 ALT 升高相平行。在治疗过程中,ALT 降至正常,而血清甘胆酸仍在高水平。故评价急性肝炎恢复情况较常规肝功能化验优越。在慢性肝损害恢复期,血清甘胆酸降至正常较常规肝功能化验要晚,有人作组织学检查,发现甘胆酸的升高与否和组织学检查一致。肝硬化时血清甘胆酸高于正常,故本法诊断肝硬化有较高的诊断价值。肝癌时血清甘胆酸明显增高,阳性率可达 100%。

(2)餐后 2h 血清甘胆酸:餐后胆囊收缩,大量胆汁在回肠末端被吸收进入肝循环,当肝细胞受损时此项功能低下,从而进入血液量增加,测定餐后血清甘胆酸较测空腹血清值更能反映肝细胞轻微损伤。

(五) 注意事项

1. 本法除加 ANS 作阻断剂外,样品血清作 1∶10 稀释后放沸水浴中 3～5min。变性可使甘胆酸解离。

2. 本法除测定血清外,也可将尿液作 1∶20～1∶50 稀释后直接测定。尿中排出值和血清浓度高度相关,其临床应用价值完全相同,故可在化学性肝损害动物模型中收集受试动物尿液动态观察肝损害的变化。

四、肝纤维化测定

(一) 原理

肝胶原纤维是纤维化的基础。在胶原纤维中,羟脯氨酸约占 12.5%。通过测定肝脏羟脯氨酸的含量可评价肝脏纤维化的程度。肝胶原纤维酸性水解释放羟脯氨酸,羟脯氨酸可被氯胺T氧化成吡咯,后者与对二甲基氨基苯甲醛溶液(Ehrlich 试剂)形成一种红色物质,再用分光光度计比色定量。按羟脯氨酸含量占胶原含量的 12.5% 来计算肝脏胶

原纤维含量。

（二）试剂与器材

1. 羟脯氨酸标准溶液　取反式 1 羟基 L 脯氨酸 500mg，加蒸馏水溶解并定容至 1000ml 即浓度为 500μg/ml。再分别稀释成 1、2、4、8、16μg/ml 5 个标准溶液。

2. 柠檬酸盐缓冲液　取单水柠檬酸 150g、二水柠檬酸钠 320g、氢氧化钠 91g，加冰醋酸 32ml，正丙醇 800ml，蒸馏水 3000ml。调 pH 值至 6.0～6.5 之间，最后用蒸馏水稀释至 4000ml，加 1ml 或 2ml 甲苯保存备用。

3. 氯胺 T 溶液　取 1.76g 氯胺 T 水合物溶于 125ml 蒸馏水中。

4. Ehrlich 试剂　取 18.75g 对二甲基氨基苯甲醛溶于 75ml 1 丙醇和 32.5ml 70%高氯酸中，然后用蒸馏水稀释至 125ml。临用前配制。

5. 器材：手术剪、手术镊、吸管（1ml、2ml、5ml、10ml）、量筒（100ml、250ml、1000ml）、容量瓶（1000ml）、玻璃匀浆器、电子天平（感量 0.1mg、1mg）、试管、高压灭菌器、真空干燥器、722 分光光度计、比色皿等。

（三）操作步骤

1. 配制 1%盐酸肝匀浆溶液　从麻醉动物体内取出肝脏，取 1g 肝左叶，加 9ml 6N HCl 匀浆，即得 10%匀浆液。再取此匀浆液 1ml，加 9ml 6N HCl 再匀浆 1 次，即得 1%匀浆液。

2. 取 2.5ml 1%匀浆液分别置入 12ml 圆形耐热试管中（平行样品管），盖上玻璃球塞，以防蒸发，将试管放入高压灭菌器内，于 120℃，210kPa（2.07atm）条件下消毒 3h。

3. 去掉玻璃试管球塞，将试管置于中度真空并含有一层硫酸钙的干燥器内，维持内部温度在 50℃～60℃，干燥 18～24h，收获干燥的样品水解产物。

4. 将干燥的样品水解产物悬浮于柠檬酸盐缓冲液中即为样品悬浮液，从样品悬浮液中吸取 2ml 分别置于已编号的干净试管中。

5. 取已编 1、2、3、4、5 号的 5 支干净试管（标准色列管），各加 1ml 柠檬酸盐缓冲液，再分别加入 1ml 浓度为 1、2、4、8、16μg/ml 羟脯氨酸标准溶液，摇匀，以柠檬酸盐缓冲液做对照液。

6. 加 1.5ml 氯胺 T 溶液于对照液管、样品管和标准色列管中，于室温下培养 22min，在培养过程中配制 Ehrlich 试剂。

7. 以上各管加 1.5ml Ehrlich 试剂，摇匀，60℃水浴 15min。

8. 冷却试管，用柠檬酸盐缓冲液校正分光光度计，在波长 500nm 处比色测定。

（四）结果计算与评价

以羟脯氨酸标准溶液浓度为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制标准曲线。根据样品吸光度从标准曲线查出样品中羟脯氨酸的浓度（C，μg/ml）。

肝脏胶原含量（X，%）计算：

公式：

$$X(\%) = (C \times V \times 1/1000000/0.025 \div 0.125) \times 100\%$$

式中：C：样品中羟脯氨酸的浓度（μg/ml）；

V：样品悬浮液总量（ml）；

0.025：参与测定的肝脏取样量（g）；

0.125：胶原中羟脯氨酸含量比。

评价：肝脏中胶原含量越高，肝脏纤维化的程度越大。

（五）注意事项

1. 样品混悬液中羟脯氨酸浓度宜在2～8μg/ml，必要时根据动物种类和处理情况进行调整。

2. 氯胺-T溶液与Ehrlich试剂须在临用前配制。

第二节 肝损害的体外评价方法

一、体外离体肝灌流与分析

肝脏是化学物质包括医用药物在体内的主要代谢器官。进入机体后化学物质可通过肝脏进行生物转化和生物转运，其代谢结局可有解毒（失活）或增毒（活化）两个作用。研究化学物质在肝脏的代谢与动力学变化对了解化学物质毒性及其毒作用机制具有重要意义。离体灌流肝脏法（isolated perfused liver，IPL，亦称离体肝灌流法）在一定程度上可保留肝细胞结构和功能上的完整性，保留着细胞膜的屏障与正常体液的供给。但它又与整体动物实验不同，它可以排除机体其他脏器和系统的影响，能单独地动态观察与研究肝脏对化学物质的处置和反应。

（一）基本原理

IPL技术是在麻醉状态下用外科手术使大鼠肝脏形成体外循环，用蠕动泵将以氧和二氧化碳饱和的Krebs-Henseleit溶液代替血液，恒温恒速地灌注肝脏，使之在一定时间内（数小时）维持机体的正常生理生化功能。这样可以在人工控制的剂量和条件下，直接动态观察化学物质通过肝脏后的代谢规律及其对肝脏的毒作用影响。

（二）试剂与材料

1. 灌流液的配制　灌流液为低分子量葡聚糖的Krebs-Henseleit溶液，各组成成分的浓度如下（以mmol/L表示）：KCl 4.8、$MgSO_4$ 1.2、$CaCl_2$ 2.4、KH_2PO_4 1.2、$NaHCO_3$ 12.5、NaCl 118.4、葡萄糖10、HEPES 25与5%葡聚糖（分子量为40,000），pH 7.0～7.2。通常以贮存液保存于冰箱备用，使用前配制工作液。

（1）贮备液：KCl 7.1g、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 5.87g、$CaCl_2$ 5.62g、KH_2PO_4 3.26g、NaCl 82.00g，加去离子水到1000ml。

（2）工作液：实验前1天先把葡聚糖按10% W/V配好，放置过夜。临用前用10%葡聚糖150ml，加上述贮备液50ml、$NaHCO_3$ 2.08g、葡萄糖1.80g与HEPES 5.94g，加去离子水950ml，用1mol/L NaOH调pH至7.0～7.2，用去离子水定容至1000ml。

2. 材料

（1）灌流仪：一般灌流仪包括以下三个主要部分即：①供氧贮液系统，带搅拌混合的贮液池，通过流量计与普氧钢瓶（含95%氧与5%二氧化碳）相连。②循环系统，由医用硅胶管与蠕动泵两部分组成，为了除去灌流液中的破碎细胞或其他凝集物在此系统中设过滤装置。③隔水式恒温系统，单独自动控温水浴系统，使贮液池和脏器托盘等保持一定温度。目前市场上均有各种脏器灌流仪购买。

(2)手术器械：手术刀、手术剪、手术镊、止血钳等。

(3)玻璃器皿：吸管(1ml、2ml、5ml、10ml)、量筒(50ml、100ml、250ml、1000ml)、容量瓶(100ml、500ml、1000ml)、烧杯(100ml、250ml、500ml)。

(三) 操作步骤

1. 一般选用体重为220～250g大鼠的肝脏作肝灌流模型，术前给大鼠腹腔注射2%硫苯妥钠0.8～1.0ml，麻醉后将动物仰放在手术板上，行腹部U形手术切口。

2. 打开大鼠腹腔，将肝脏移向躯体左侧，暴露下腔静脉和门静脉。

3. 用丝线结扎下腔静脉与右肾之间的血管。

4. 先将流出导管插入下腔静脉，固定后立即注入1%肝素1～2ml，使血液流出并保持通畅。

5. 再将注入导管插入门静脉，固定后立即开动蠕动泵注入灌流液。

6. 打开胸腔后，在靠横膈一侧结扎下腔静脉上端。这样，由门静脉注入的灌流液经肝脏后只由腹腔部分的下腔静脉流出。

7. 将肝脏完整无损地分离出来并移到灌流仪的脏器托盘上，并覆盖玻璃罩以保持一定湿度。肝脏移到灌流仪的脏器托盘时，先用灌流液应用液冲洗肝脏内残存血液，必要时可用手轻轻按摩帮助把血洗净(从肝脏外观和流出液颜色可以辨出)。调整灌流速度[大约为1ml g(肝)·min]，检查保温温度[(37±0.2)℃]，打开普氧瓶开关检查一切合格后开始实验。

8. 将受试化学物或毒物加入贮液池后，经过肝脏后立即流出，在不同时间，灌流液通过肝脏后立即收集下腔静脉流出液进行测定(一过式灌流)。也可将下腔静脉流出液经过过滤装置后直接返回贮液池进行循环式灌流。这样被测化学物质可以不断地通过肝脏。根据研究目的在不同时间采样，或者在不同时间测定肝脏组织本身的改变如肝酶、化学成分、组织学变化等。

(四) 分析与评价

分析和评价离体大鼠肝脏活力的方法很多。

1. 物理性检测　测定灌流液pH、灌流压力、肝重、肝的外观等。

2. 生化性检测　测定灌流液中ALT、AST、LDH、OCT、SDH等酶活性、氧消耗量以及BSP排泄率等。

3. 组织学检查　灌流肝脏后，用光镜或电镜检查肝脏组织的病理学改变。

比较实验组与对照组以上各项指标是否存在统计学差异。

(五) 注意事项

1. 整个手术过程要求干净利落，保持肝脏薄膜完整，以防出血过多和手术时间过长，尤其是肝门静脉插管时间，也就是缺氧时间不得超过5s。插管后立即提供含氧灌流液。手术不要求无菌操作，也无需注射抗生素。

2. 在大鼠离体肝灌流中，实验组与对照组的各项条件应保持恒定，以保证肝活力的可比较性。一般灌流温度为37℃，灌流液PO_2至少45mmHg，灌流速度可因不同灌流液(即灌流介质)进行调整。灌流开始后，需稳定灌流条件20min左右，使肝各项功能趋于稳定，再进行试验。

3. 大鼠肝重量应保持体重的3%～4%。在大鼠离体肝灌流中，测氧耗是反映肝活力

的很好指标，它可直接反映肝活性情况，正常情况下氧耗为 2. μmol min，但测氧耗需专门的测氧仪。BSP 排泄实验也是测定肝排泄功能的较好方法，其胆汁总排泄率应大于 4 %（一般在 60%左右）。

二、大鼠肝细胞原代培养实验方法

（一）基本原理

离体的大鼠肝细胞原代培养试验，是整体动物与离体肝之间、可溶性肝酶与肝脏组织之间的一种中介实验模型，该试验方法越来越多地被用于毒理学研究领域。大鼠肝细胞分离方法是在肝离体灌流液中引进胶原酶，经胶原酶消化肝细胞间组织而达到分散肝细胞的目的。然后再经分离纯化步骤而得到所需的肝细胞或非实质性肝细胞。进行大鼠肝细胞原代培养，可观察化学毒物对肝脏的毒性作用。

（二）试剂与材料

1. 试剂

（1）无钙灌流液：准确称取 NaCl 8.300g、KCl 0.500g、HEPES 2.383g、NaOH 0.220g 溶于约 950ml 蒸馏水中，混匀后，调 pH 至 7.4，用蒸馏水定容至 1000ml。

（2）酶灌流液：准确称取 NaCl 3.916g、KCl 0.500g、$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.735g、HEPES 23.830g、NaOH 0.264g 溶于约 950ml 蒸馏水中，混匀后，加胶原酶 0.500g，混匀后，调 pH 至 7.6，用蒸馏水定容至 1000ml。

（3）清洗液：准确称取 NaCl 8.300g、KCl 0.500g、$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.176g、HEPES 2.383g、NaOH 0.220g 溶于约 950ml 蒸馏水中，混匀后，调 pH 至 7.4，用蒸馏水定容至 1000ml。

2. 仪器

（1）灌流仪：同离体肝灌流试验。

（2）细胞纯化与细胞培养：振荡器、锥形瓶、离心机、离心管、吸管、烧瓶、容量瓶、尼龙网、显微镜、红细胞计算器、CO_2 培养箱、氧气瓶、CO_2 钢瓶等

（三）操作步骤

1. 肝细胞的分散　在肝离体灌注条件下，先用无钙灌流液作预灌流，目的在于冲去残血，除去或减少肝细胞间的钙离子，以减少细胞间的粘附力。然后再用含钙的胶原酶灌流液灌流，以消化细胞间质而分散肝细胞。具体步骤如下：

（1）动物手术：取体重为 150～200g 的大鼠，乙醚麻醉，背位固定。分离剥去腹部皮肤后，用 75%乙醇消毒腹膜外层，无菌操作下剪开腹膜，将内脏翻移至鼠体的左侧，暴露肝门静脉和下腔静脉。在离肝入口 1.0～1.5cm 处将肝门静脉以及下腔静脉近肾静脉分支部位与周围组织分离开，各穿一根手术棉线，打一活套备用。并经下腔静脉注射 0.06%肝素生理盐水溶液 0.5～0.6ml，注射点尽量靠后。将静脉插管沿已分离的肝门静脉插入，使针头前端达左右肝静脉分支交汇处，迅速结扎棉线，固定门静脉插管。立即开始灌流。

（2）预灌流：将经无菌过滤、37℃恒温、混合气体（95% O_2，5% CO_2）饱和的无钙灌流液进行肝灌流，同时剪断下腔静脉以便灌流液顺畅流出。灌流速度需从慢至快，最后保持在 40～50ml/min。用骨剪打开胸腔，在前腔静脉管处系一根棉线，尽快从右心房处插管

至前腔静脉处，然后扎紧手术丝线，以防针管脱落。如果插管位置适当，应有灌注液从导管中流出。随之将后腔静脉处的棉线扎紧，迫使灌注液改由前腔静脉插管处流出。先作在位灌流数分钟，然后边灌流边切断肝与周围组织的联系，将肝移置肝托盘内继续灌流。注意不要损伤肝包膜，并尽量保持肝叶和血管的正常位置，不可扭曲。预灌流一般需用灌流液约为500ml。

(3)酶灌流：预灌流后换用37℃通入O_2的酶灌流液继续灌流。胶原酶的浓度应根据酶制剂的型号、活力等经过试验后调整决定，一般约为0.05%左右。胶原酶溶液的最适pH为7.5，灌流液含钙而不能含镁，且须含足够的有机缓冲剂（如HEPES）。灌流速度仍维持40～50ml/min。因为胶原酶价贵，可设计循环灌流装置以节约酶量。一般每次用40～50ml酶灌流液即可满足要求。如果灌流通畅，则肝颜色均匀。由于肝细胞间质被消化，灌流液进入细胞间隙，因而可见到肝逐渐肿胀。一般酶灌流时间约为8～15min。可以肉眼观察肝肿胀程度来选择最佳灌流时间。

(4)分散肝细胞：在酶灌流达最佳效果时取下受试动物肝脏，将之移至盛有适当培养液（一般为DMEM溶液）的平皿中，小心撕去肝包膜后将肝在培养液中剪碎，轻轻振摇，肝细胞即可散落于培养液中而成肝细胞悬液，必要时可用光滑的玻璃针或疏齿小梳轻轻梳理，以利于肝细胞分散。

2. 肝细胞的纯化

(1)肝实质细胞的纯化：将肝细胞悬液收集在锥形瓶中，于37℃振荡培养15min。在此期间，受损肝细胞进一步排出其内容物而变得更轻，易于在离心时与完整细胞分开；细胞碎片、Kupffer细胞等则为由损伤细胞排出的粘性物质粘结成小块，可在过滤时除去；完整的肝实质细胞则从外形不规则渐变为圆形，因而更加分散，也更易于通过滤网。振荡培养结束后立即将锥形瓶置冰水中冷却，用双层尼龙网（200目）过滤。滤液在0℃～6℃条件下以200r/min离心3～5min，弃去上清，用清洗液以同上条件清洗离心3次，末次弃上清液后以培养液再次悬浮，此悬液中得到的肝细胞绝大部分为肝实质细胞。

(2)非实质细胞的纯化：将分散所得肝细胞悬液与蛋白酶（pronase）一同振荡培养60min，肝实质细胞因对蛋白酶特别敏感而大部被破坏。经过离心清洗即可得到纯化的非实质细胞。占非实质细胞约40%的Kupffer细胞特别容易在塑料培养皿上贴壁生长，可利用此特性获得完全纯化的Kupffer细胞。

3. 肝细胞的培养 用培养液适当稀释纯化的肝细胞悬液，使每毫升培养液中约含$(0.5\sim1.0\text{ml})\times10^6$个肝细胞左右。培养液可选用DMEM，也可选用其他配方。培养液中需有适量的葡萄糖和充分的缓冲系统。向培养液中加入适量小牛血清或清蛋白对细胞有一定保护作用，另可加入适量激素和抗生素。

培养的方式可根据实验需要来选择。只需作短时间培养的实验可将适当稀释的肝细胞于合适的小试管内作振荡培养，培养以后的实验步骤即可直接在此管内进行。如需作较长时间培养，则要选用大小合适的培养皿加入适量的肝细胞，于CO_2培养箱内（通入5%的CO_2与95%O_2）进行单层细胞培养。如采用经过处理的塑料培养皿，则约经1.5～2h培养细胞即可贴壁；如采用未经处理的玻璃培养皿，则需经8h左右肝细胞方能完全贴壁。

（四）分析与评价

肝细胞质量，可通过肝细胞活率和肝细胞产量2个指标进行分析与评价。

(1)细胞活率：用0.6%苔盼蓝溶液与肝细胞悬液以1：1比例混匀，立即在光学显微镜下用血细胞计数板计数和计算能够排除苔盼蓝而不被染色的活细胞百分率(%)，即为肝细胞活率。其活率至少须在80%以上的肝细胞才适用实验研究。

(2)细胞产量：仍用血细胞计数板按血红细胞计数方法求得每毫升悬液中的细胞数，再乘以所得肝细胞悬液的总量ml数，即为细胞产量。

(五) 注意事项

1. 灌流肝是否畅通是分散肝细胞能否成功的关键。灌流过程中如果肝颜色不均匀或出现花斑，即表明灌流不畅。灌流不畅时不仅细胞间质消化不够，减少分散的细胞产量，而且分散所得肝细胞的活率和功能也差。这是因为灌流不畅时使肝细胞缺氧，同时也使灌流压力增高，两者均会造成肝细胞损伤。

灌流不畅的可能原因有：①肝位置不佳致血管扭曲；②插管插入过深，或插管尖头的斜面过长，堵塞了门脉血管的分支；③灌流液中存在小颗粒物质或微小气泡而堵塞小血管；④麻醉过深、手术时间过长、麻醉前动物过度紧张、应激反应等使血管收缩。应努力避免这些因素，使灌流畅通。

2. 灌流液必须含有足够的缓冲剂系统，以保证酶灌流过程中pH维持在最适范围。关于酶灌注灌流液是否需要通氧的问题，虽然有报道认为不通氧对所分得肝细胞的活率影响不大，但缺氧对肝细胞功能有重要影响，有时并不能立即在肝细胞活率上反映出来，故仍以通氧为好。

3. 苔盼蓝排除试验是检验细胞活率最常用的方法，但须正确运用，否则结果可能不准确。注意事项有：①染料和细胞悬液混匀后立即观察，以防放置后活细胞沉于底部；②须使台盼蓝的终浓度在0.2%以下；③应先放好盖玻片后从盖玻片边缘加样，先加样后盖盖玻片会使损伤的肝细胞被挤排出，致使观察结果不准确。

4. 培养肝细胞时，每一培养容器内的细胞数要适当。细胞数过少则每一样本的实验数据可能影响试验结果的精确度；细胞数过多则细胞相互挤压或重叠，接受氧气和营养物质不充分，则会影响肝细胞功能状态。

第三节　化学性肝损伤动物模型

一、小鼠急性肝损伤模型

(一) 基本原理

四氯化碳(CCl_4)进入机体后，经肝脏细胞色素P 450激活，生成三氯甲基自由基($CCl_3^·$)，后者攻击肝细胞内质网膜上的磷脂分子，引起膜的脂质过氧化，$CCl_3^·$继而与膜脂质和蛋白质等生物大分子进行共价结合，引起膜结构和功能完整性的破坏。$CCl_3^·$还可抑制细胞膜和微粒体膜上钙泵的活性，使Ca^{2+}离子内流增加，从而引起肝细胞坏死。受试动物肝损伤后，血液中谷丙转氨酶(GPT)、谷草转氨酶(GOT)活性升高，肝脏外观呈土黄色，组织病理学检查可见肝脏炎症细胞浸润、肝细胞坏死等。

(二) 试剂与受试动物

试剂：四氯化碳、橄榄油或植物油。

受试动物：昆明种小鼠，体重18～22g，普通饲养。

（三）操作步骤

将小鼠随机分成5组，即高、中、低3个剂量组、1个对照组和1个溶剂对照组，每组20只，雌雄各半。染毒途径可选用腹腔注射或灌胃，一次性给药。腹腔注射时高、中、低剂量一般可分别为CCl_4原液2ml、1ml、0.5ml/kg体重。不同剂量组所用药液用0.1‰～1‰橄榄油或精制花生油配制所需浓度的四氯化碳受试液。给予肝毒物后禁食过夜，16～24h后断头处死动物，采集血液，离心，用试剂盒或自配试剂测定血清ALT、AST等酶活性。另外，每只动物取肝大叶相同部位的一小块肝组织固定于10%福尔马林，做病理切片检查。

（四）结果分析与评价

用方差分析比较3个剂量组与对照组、溶剂对照组动物血清酶活性差异以及是否存在剂量-反应关系。

急性CCl_4肝损伤动物模型是一种经典的实验性肝损伤模型。在形态学上主要表现为肝小叶中央区坏死和脂肪变性，血清学检查可见血清ALT和AST升高，并能灵敏地反映肝损伤的程度。一般在给予CCl_4 3h后，ALT和AST开始升高，12～13h后达到高峰，常升至正常水平的十多倍，以后呈下降趋势，90h后可恢复到正常范围。

（五）注意事项

1. CCl_4具有挥发性，可由呼吸道吸收，对人体有一定的毒性，操作时应注意。
2. CCl_4与溶剂橄榄油或植物油必须充分搅拌，需完全均匀溶解后方可染毒动物。
3. 动物注射肝脏毒物后必须禁食过夜，否则不能形成显著肝损伤。
4. 采用非腹腔注射途径给予受试物时，正式实验前宜用同批小鼠进行预试验，确定产生肝损伤的染毒剂量范围。

二、大鼠慢性肝损伤模型

（一）基本原理

四氯化碳进入体内后，经肝脏细胞色素P-450代谢为三氯甲基自由基，攻击肝脏生物大分子，引起肝细胞损伤，导致血清ALT、AST升高。动物长期给予四氯化碳后，损伤的肝细胞进一步发生纤维化，使肝脏中羟脯氨酸含量升高。肝功能受损后，肝细胞制造清蛋白的能力降低，使血清中A/G（清蛋白/球蛋白）比例降低。测定血清中ALT、AST、A/G比例和肝羟脯氨酸含量，即可评价肝损伤和肝纤维化程度。

（二）试剂与受试动物

试剂：四氯化碳、橄榄油或植物油。

受试动物：Wistar雄性大鼠，体重150～180g，普通饲养。

（三）操作步骤

将大鼠随机分成5组，即高、中、低3个剂量组、1个对照组和1个溶剂对照组，每组20只，雌雄各半。染毒剂量可参考急性毒性试验的LD_{50}值。不同剂量组受试物用0.1‰～1‰橄榄油或精制花生油配制所需浓度药液。染毒组可允许个别动物死亡，但实验结束时每组动物不得少于10只。染毒途径可选用灌胃或腹腔注射或经皮下注射，每周

5次，连续6个月。若为肝损伤的药物疗效研究，应在给CCl_4后第4或第6个月起开始给予治疗药物，给药途径最好与临床用药的途径相同，每日1次，连续1～2个月。正常对照组及肝损伤非药物治疗对照组给予相应的治疗药物溶剂，阳性药物治疗对照组给予已知对化学性肝损伤有治疗作用的药物）。于末次给药后24h断头处死动物，采集血液，离心，用试剂盒或自配试剂测定血清ALT、AST等酶活性、血清总蛋白、清蛋白，计算A/G比值。每只动物取同一部位的肝脏一块，制备肝匀浆，测定羟脯氨酸含量，作为肝纤维化形成程度的判定标准。另取肝大叶相同部位的一小块肝组织固定于10%福尔马林，做病理切片检查。

（四）结果分析与评价

用方差分析比较各组动物血清酶活性、血清总蛋白、清蛋白与肝脏羟脯氨酸含量等各项指标差异以及是否存在剂量-反应关系。

（五）注意事项

1. CCl_4具有挥发性，可由呼吸道吸收，对人体有一定的毒性，操作时应注意。

2. CCl_4与溶剂橄榄油或植物油必须充分搅拌，待完全溶解后方可染毒动物。

3. 因实验周期较长，因对毒物的反应不一可能动物出现较多的死亡，故需注意观察动物状况，开始时每组动物数以20只为宜。

三、小鼠免疫性肝损伤模型

（一）基本原理

预先给小鼠注射卡介苗（BCG）可使多核中性粒细胞或巨噬细胞聚集于肝脏，继后再用低剂量大肠杆菌脂多糖（LPS）攻击注射，可激发这些细胞释放一些毒性介质如自由基、白三烯、肿瘤坏死因子、白细胞介素1等，造成免疫性肝损伤。实验中可见受试动物血中ALT和AST水平明显升高，血清一氧化氮（NO）亦显著升高，肝脏病理检查以肉芽肿性炎症浸润为主。如观察治疗药物的疗效，使用治疗药物后，肝损伤明显减轻。

（二）试剂与受试动物

试剂：BCG、LPS、生理盐水。

受试动物：昆明种小鼠，雄性或雌性，体重22～24g，普通饲养。

（三）操作步骤

取昆明种小鼠，体重22～24g。用生理盐水配制卡介苗溶液，使每ml含10^8活菌，经鼠尾静脉注入0.2ml卡介苗溶液。12d后每只小鼠尾静脉注入7.5μg LPS的生理盐水溶液。

若进行免疫性肝损伤治疗药物研究，将免疫性肝损伤小鼠随机分为药物治疗组、非治疗组、阳性药物对照组，另设正常对照组。其中药物治疗组又设高、中、低3个剂量组。正常对照组与免疫性肝损伤非治疗组给予同体积的药物溶剂。给药途径与疗程应与临床用药基本一致。治疗药物可在注射LPS前0.5～1h给予，于注射LPS 12h后断头处死动物，采集血液，离心，用试剂盒或自配试剂测定血清ALT、AST等酶活性。另取肝大叶相同部位的一小块肝组织固定于10%福尔马林，做病理切片检查。

（四）结果分析与评价

用方差分析比较各组动物血清酶活性差异。与损伤对照组相比，治疗药物组动物血

中升高的转氨酶显著降低、肝脏病理损伤明显减轻。

(五) 注意事项

1. 不同批号的卡介苗活性有较大差别，需对每批卡介苗的活性做预实验，确定适宜剂量后进行上式实验。

2. 本模型中，血清 ALT、AST 水平的变化随 LPS 剂量的增加而增加，在注射 LPS 12h 后达峰值，以后逐渐下降，因此，血清 ALT、AST 测定应在注射 LPS 后 24h 内进行。

（钟才高）

第十章

肾脏毒理学研究方法

第一节　体内实验

一、尿液的一般生化指标

尿液是血液经肾小球滤过，肾小管和集合管的重吸收及分泌产生的终末代谢产物。尿液的组成和性状可反映机体的代谢状况，且受机体各系统功能状态的影响，尤其与泌尿系统直接相关。因此尿液的变化，不仅反映泌尿系统的疾病，而且对其他系统疾病的诊断、治疗及预后均有重要意义。

（一）尿蛋白

终尿中蛋白质的含量很少，一般尿蛋白定性试验呈阴性。当某些因素引起尿蛋白含量>100mg/L或150mg/24h尿，蛋白质定性试验呈阳性反应而称为蛋白尿（proteinuria）。导致蛋白尿的原因很多，①肾小球性蛋白尿；②肾小管性蛋白尿；③混合性蛋白尿；④溢出性蛋白尿、⑤组织性蛋白尿；⑥偶然性蛋白尿或假性蛋白尿等。

（二）β_2 微球蛋白

β_2 微球蛋白（β_2M）是一种分子量仅为11,800的低分子量蛋白质，为细胞膜上完整组织相容性抗原的一部分，主要由淋巴细胞产生。当细胞处于旺盛的生理状态时，β_2 微球蛋白的产生最快。β_2 微球蛋白在人体内的浓度相当稳定，容易通过肾小球滤膜，但99.9%由近曲小管以胞饮形式摄取（即重吸收），并在肾小管细胞中降解成氨基酸。可用放射免疫法或酶标法进行测定。肾小管重吸收功能发生障碍时，尿液中 β_2 微球蛋白含量常增高。测定 β_2 微球蛋白有助于了解肾小管病变。当服用庆大霉素、多粘菌素或卡那霉素后，尿液 β_2 微球蛋白明显增高时，应注意停药或改换其他药物。已知癌细胞、肉瘤细胞等也可产生 β_2 微球蛋白，故恶性肿瘤患者血液及尿液中 β_2 微球蛋白含量常增高。

（三）尿酶

尿酶是肾损害早期和敏感的指标之一。正常情况下尿酶主要来自于血浆和脱落及坏死的肾细胞或泌尿道上皮细胞。不同的酶来自于肾脏的不同部位，可以作为不同肾脏部位损害的标记酶。碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，ALP）和 γ 谷氨酰转移酶（γ glutamyl transferase）活性增高，是刷状缘损害的标记酶。而其他的一些酶，如乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）和谷氨酸脱氢酶（glutumate dehydrogenase，GDH）分别存在于细胞浆和线粒体，如果它们的活性增高则提示可能有广泛的细胞损伤。尿N乙酰β

D-氨基葡萄糖苷酶(N-acety. β D-glucosam.nidase,NAG)在肾细胞的溶酶体中含量很高。NAG及其同工酶,可作为近曲小管溶酶体损伤的标记酶,被广泛推荐用作评估肾小管损伤的早期生物标志物,而NAG同工酶B更为灵敏。一般用荧光分光光度法测定。也可用于毒理学研究。

值得注意的是,在化学性损害时,由于细胞内的酶大部分在早期即排出,尿酶常常是一过性的,因此如果没有尿酶并不一定表示没有肾损害。其在急性肾损害中的应用较慢性肾损害更有效。肾酶的分布存在相当大的种属差异。一般而言,大鼠肾酶分布较接近人类,宜作尿酶研究的首选动物。在收集尿样时必须注意防止粪便污染,因为有些酶(如ALP、LDH等)在粪便中的活性比尿酶高得多。尿液需在低温下(4℃)收集和贮存,有条件时,最好在分析之前要进行透析,以除去抑制物。

(四)尿糖

正常尿内可有微量葡萄糖,定性试验为阴性。当血糖浓度超过8.88mmol/L,尿中糖量会增高。一般定性方法测定的是葡萄糖,偶见乳糖尿等。葡萄糖尿的形成原因有:①糖代谢异常使血糖升高超过了肾糖阈所致;②血糖虽未升高但肾糖阈有降低时所致肾性糖尿。

(五)尿钙

肾是钙排泄的重要器官,肾小球每日滤出的钙约10g,其中1/2在近曲小管吸收,1/3在髓袢升支重吸收,其余在近曲小管和集合管吸收,仅1%随尿排出。人体钙的代谢是个复杂过程,需经过神经体液的调节。甲状旁腺素、降钙素和维生素D是三种最主要的体液调节因素,骨骼、肠道和肾是体液调节因素的三个主要靶器官。甲状旁腺素具有促进溶骨作用,使血钙升高。降钙素具有抑制骨盐溶解作用,使血钙降低。维生素D有促进肠钙吸收作用,可调节血钙浓度。因此当三种体液因素发生异常或三个靶器官有病变时,均能引起钙代谢的紊乱,从而导致血钙和尿钙异常。甲状旁腺功能减退、慢性肾衰竭、慢性腹泻等情况下尿钙降低、甲状旁腺功能亢进和多发性骨髓瘤时尿钙增加。

了解血液尿液一般生化指标的正常值及引起改变可能的原因,并结合相应的临床资料进行综合的分析,对协助临床明确疾病的诊断、观察病情、制定防治措施、判断预后等均有重要的意义,也为开展医学实验研究提供必需的技能和有益的数据资料。

二、肾脏血流动力学和血流量分析

肾脏是维持体内环境相对稳定的最重要的器官之一。通过尿的生成和排出,排泄废物、调节细胞外液容量和渗透压、保持体液内重要电解质、排出氢离子,维持酸碱平衡。同时由于肾脏血液供应十分的丰富,而肾小球毛细血管内血压直接影响肾小球的滤过作用,同时肾小管周围的毛细血管网的压力也影响着肾小管的重吸收。因此对于肾脏血流动力学及血流量的分析有助于我们了解正常肾脏的功能,以及肾脏的病理变化。

(一)肾脏血流动力学和血流量

通常所说的肾脏血流量主要是指肾皮质血流量。肾血流量可通过肾血流量的自身调节和神经体液调节。肾血流量的自身调节表现为动脉血压在一定范围内变动时,肾血流量仍然保持相对恒定。当肾血流量和肾小球滤过率增加时,到达远曲小管致密斑的小管液的流量增加,致密斑发出信息,使肾血流量和肾小球滤过率恢复到正常。相反,当肾血

流量和肾小球滤过率减少时，流经致密斑的小管液的流量就下降，致密斑发出信息，使肾血流量和肾小球滤过率增加至正常水平。肾血流量的神经、体液调节使肾血流量与全身的血液循环调节相配合。肾交感神经活动加强时，引起肾血管收缩，肾血流量减少。总之，在通常的情况下，在一般的血压变动范围内，肾主要依靠自身调节来保持血流量的相对稳定，以维持正常的泌尿功能。

影响肾血流动力学的因素还有球管反馈和血管紧张素等。球管反馈是肾小球旁器实现对肾小球血流动力学调节的主要途径之一，即当致密斑 Na^+ 浓度降低时，肾小球入球小动脉收缩以提高肾小球滤过率，从而维持高肾小球滤过率和高重吸收率的功能。由于球管反馈的作用，使肾小球旁器可以控制肾小球血流动力学。球管反馈调控肾小球血流动力学和肾素一样也受多种因素调节，一氧化氮(NO)是其中一种重要的物质。NO 对肾小球毛细血管压、肾小球血流量及肾小球超滤过系数均存在生理调节，而且可降低球管反馈的敏感性和反应性。血管紧张素Ⅱ可能是造成球管反馈过度反应的原因。注入外源性血管紧张素Ⅱ可使全肾特别是浅层皮质血流量减少，用血管紧张素Ⅱ受体抑制剂后血流量可增加 90%，提高肾小球超滤过系数并减少大分子滤过。近端小管细胞表达血管紧张素原、肾素、ACE。其细胞膜上有两种类型的血管紧张素Ⅱ受体和信号转导系统，并具有可使血管紧张素失活的血管紧张素蛋白酶。血管紧张素Ⅱ在肾髓质的密度是皮质的 4～5 倍，而大多数皮质血管紧张素Ⅱ储存于肾间质液和肾小管液。近端小管细胞包含合成和分泌血管紧张素Ⅱ所需的所有成分，其合成的血管紧张素Ⅱ是肾素-血管紧张素系统产生的近百倍，并不断将血管紧张素Ⅱ分泌入肾小管液而使肾小管上皮细胞内血管紧张素Ⅱ处于低剂量范围，因此局部合成的血管紧张素Ⅱ主要作用于小管腔面细胞膜上的血管紧张素Ⅱ受体，并调节依赖于血管紧张素Ⅱ的近端和远端小管的转运功能和尿液酸化过程，以及收缩出球小动脉和系膜细胞调节肾血流量，这些作用都与肾素-血管紧张素系统的血管紧张素调节无关，提示肾内肾素-血管紧张素系统具有相对独立性。

(二) 血流动力学与血流量测定

超声多普勒肾血流测定是现在发展起来的一种新的肾血流动力学与血流量测定方法。超声多普勒肾血流测定，可以见到肾内血管，准确测量肾血流速度，推测肾内血管床阻力。已被逐渐应用到肾血管性高血压的诊断、肾移植的急慢性排斥反应、肾动脉对血管活性物质的反应、肾功能评价等方面。

超声多普勒肾血流测定的参数较多，其中以收缩期峰速度(Vs)、舒张期速度(Vd)、平均速度(Vm)、S/D、脉动指数(PI)、阻力指数(RI)六项参数诊断意义较大且可重复性好。①Vs：主要反应肾血管充盈度和血流的供应强度。②Vd：主要反应血管的顺应性和血管床的阻力。③S/D：主要反映血管的阻力。在微血管阻力的犬模型中证实肾血管阻力与 S/D之间具有良好的相关性。④PI、RI：主要都用于反应血管床的阻力状态。另一个常用的参数是收缩早期加速度(ESA)，与加速度指数(AI)类似。

三、肾小球滤过率和肾脏清除率测定

肾小球的滤过功能是形成尿液的第一个环节。当血液流过肾小球毛细血管网时，血浆中的水和小分子溶质，包括少量分子量较小的血浆蛋白，通过滤膜滤到肾小囊的囊腔内，形成滤液(原尿)。除了不含血细胞和血浆蛋白质外，其余成分和血浆中相同。决定肾

小球滤过作用的因素主要有三方面：滤过膜通透性是滤过的结构基础；有效滤过压是滤过的动力；肾血浆流量(renal plasma flow)是滤过的物质基础。肾小球的滤过量大小可用肾小球滤过率(glomerular filtration rate，GFR)表示，即单位时间内两肾生成的滤液量。肾小球滤过功能在肾的排泄功能中占有重要位置，肾小球滤过率是衡量肾功能的重要指标。

肾脏清除率(renal clearance，RC)是1928年Van Slyke制定的，表示肾脏在单位时间内(每分钟)将多少毫升血浆中的某物质清除出去。以公式表示如下：

$C = UV/P$

C：清除率(ml/min)；

V：每分钟尿量(ml/min)；

U：尿中测定物质的浓度(mmol/L)；

P：血中测定物质的浓度(mmol/L)。

由于此公式计算得到的清除值是被测者个体的结果，但个体大小、高矮、胖瘦、年龄等差异很大，必须标准化，以标准的体表面积 $1.73m^2$ 校正。A代表个体的体表面积。

校正后的清除值　$C = UV/P \times 1.73/A$

体表面积的计算：

$$\log A(m^2) = 0.425\log[\text{体重 kg}] + 0.725\log[\text{身高 cm}] - 2.144$$

血浆中所含某一物质小部分经肾小球滤过，不被肾小管重吸收，而且血中剩余部分又可全部由肾小管分泌，使这一物质通过肾后几乎全部排出，那么它的清除率既代表肾血浆流量(RPF)，又可反映肾小管的分泌功能，如对氨基马尿酸、碘锐特、酚红和青霉素等。某物质经肾小球滤过后，完全被肾小管重吸收，其清除值等于0，例如葡萄糖。在血浆浓度接近肾糖阈时，利用清除值公式，可计算出滤液中被重吸收的葡萄糖量即肾小管葡萄糖最大重吸收量，用以反映近端肾小管的重吸收功能。若另一物质能全部经肾小球滤过，肾小管对其不吸收、不排泄，则其清除率可反映肾小球的滤过率，如菊粉、肌酐等。

(一) 肾小球滤过率

1. 菊粉清除率测定　菊粉(inulin)是一种植物多糖，分子量为5200左右，完全由肾小球滤过，不被肾小管重吸收或分泌，是理想的测定GFR的物质，其清除率(125ml/min)可准确反映肾小球滤过率。其他类似的物质有肌酐、甘露醇、硫代硫酸钠和51Cr-EDTA等。在这些物质中菊粉最为适合，但菊粉是外源性物质，测定方法麻烦。临床上多测定内生肌酐清除率，它具有测定方法简单的优点。

2. 内生肌酐清除率(Ccr)　人体肌肉以每分钟1mg速度将肌酐排入血中，血浆肌酐浓度比较稳定，受外界因素如蛋白质的摄人等影响较小。从肾小球滤过后，不被肾小管重吸收和分泌，只要同时测定血和尿中肌酐浓度，并记录每分钟尿量就可计算出内生肌酐清除率。

每分钟肌酐清除率：

$$Ccr = \frac{\text{尿肌酐浓度}(\mu mol/L) \times \text{每分钟尿量}(ml/min)}{\text{血肌酐浓度}(\mu mol/L)}$$

$$\text{校正清除率} = Ccr \times \frac{\text{标准体表面积}(1.73m^2)}{\text{实际体表面积}}$$

参考值：根据体表面积校正后，范围为 80～120ml/(min·1.73m²)。

在严格控制条件下，尿中肌酐排泄量相当稳定，故可将 24h 法改用 4h 法测定 Ccr。

测定内生肌酐清除率来估计肾小球滤过率，是使用最多的方法，但从理论上说不如菊粉，因为当血中肌酐明显增高时，可有一小部分肌酐由肾小管分泌到尿中。此时测出的肌酐清除率高于实际的肾小球滤过率。又由于血浆中肌酐浓度较低，常用的碱性苦味酸试剂显色法（Jaffe 反应）有其他干扰因素存在，常使血浆测定值偏高，而使清除值低于菊粉清除值。

肾小球病变时，一部分肾小球破坏，滤过面积减少，肾小球滤过率可明显下降，但由于肾脏有强大的贮备能力，余下的肾单位仍能排出日常机体所产生的尿素和肌酐等代谢产物，血浆中这些物质浓度变化不大。只有当肾小球滤过率下降到正常的 50%以下时，血浆中尿素及肌酐浓度才出现增高，当肌酐高达 618.8～707.2μmol/L 时，肾小球滤过率已明显下降到仅及正常的 10%。说明测定肾小球滤过率比测定血浆尿素和肌酐含量更为灵敏可靠。

（二）血肌酐和尿素浓度测定

血清肌酐（serum creatinine，Scr）和血尿素氮（blood urea nitrogen，BUN）的浓度取决于机体氮的分解代谢与肾脏的排泄能力。在摄入食物及体内分解代谢比较稳定的情况下，其血浓度取决于肾排泄能力，因此，Scr 和 BUN 浓度在一定程度上可反映肾小球滤过率功能的损害程度，是常用的肾功能指标。

1. 尿素氮的测定方法　可分为两大类：直接法，尿素直接和试剂作用，测定其产物，最常见的为二乙酰一肟法；尿素酶法，用尿素酶将尿素变成氨，然后用不同的方法测定氨。

（1）二乙酰一肟法（直接法）：尿素可与二乙酰作用，在强酸加热的条件下，生成粉红色的二嗪化合物（Fearom 反应），在 540nm 比色，其颜色强度与尿素含量成正比。二乙酰不稳定，用二乙酰一肟代替，后者遇酸水解成二乙酰。试剂中加入 Fe^{3+} 或 Cd^{2+} 及硫氨脲，可提高灵敏度，增加显色稳定性，其中 Fe^{3+} 和 Cd^{2+} 有氧化作用，还能消除羟胺的干扰作用。提高酸的浓度可增加灵敏度。二乙酰一肟与尿素的反应不是专一的，与瓜氨酸也有显色。本法灵敏、简单，产生的颜色稳定，缺点是加热时有异味释放，一般已很少使用此方法。

（2）尿素酶法：尿素酶法利用尿素酶催化尿素水解生成铵盐，铵盐可用纳氏试剂直接显色、酚-次氯酸盐显色或酶偶联反应显色。尿素测定目前多采用尿素酶偶联法：用尿素酶分解尿素产生氨，氨在谷氨酸脱氢酶的作用下使 NADH 氧化为 NAD^+ 时，通过 340nm 吸光度的降低值可计算出尿素含量。这是目前自动生化分析仪上常用的测定原理。此外，尿素酶水解尿素产生氨的速率，也可用电导的方法进行测定，其电导的增加与氨离子浓度有关，反应只需要很短的时间，适用于自动分析仪。

1）酚-次氯酸盐显色法：尿素酶水解尿素生成氨和酚及次氯酸盐，在碱性环境中作用形成对-醌氯亚胺，亚硝基铁氰化钠催化此反应。对-醌氯亚胺同另一分子的酚作用，形成吲哚酚，它在碱性溶液中产生蓝色的解离型吲哚酚。此反应敏感，血清用量少（10μl），无需蛋白沉淀，一般用于手工操作测定中。

2）纳氏试剂显色法：尿素经尿素酶作用后生成氨，氨可与纳氏试剂作用，生成棕黄色的碘化双汞铵。

尿素酶法的优点是反应专一，特异性强，不受尿素类似物的影响，缺点是操作费时，且受体液中氨的影响。

尿素测定用血清或血浆，体液中尿素的浓度常用尿素中含有的氮来表示，称为尿素氮。如欲换算成尿素，可根据60g尿素含有28g氮计算，即1g尿素相当于0.467g尿素氮，或是1g尿素氮相当于2.14g尿素。

正常参考值：血清尿素氮为2.8～7.1mmol/L，相当于尿素1.8～6.8mmol/L。

2. 尿肌酐测定　肌酐与碱性苦味酸试剂反应产生红色(Jaffe反应)，仍是目前常用的测定方法。为提高其准确性现已改为动力学测定法。

(1)Jaffe反应法：测定肌酐最常用的方法是尿、血清中的肌酐与苦味酸盐作用，生成黄红色的苦味酸肌酐复合物。此法的缺点是特异性不高，维生素C、丙酮酸、丙酮、葡萄糖、乙酰醋酸、果糖、氨基马尿酸、蛋白质、胍基醋酸酰胺及许多化合物也能与碱性苦味酸盐生成红色，这些物质统称为假肌酐，相当数量的假肌酐存在于红细胞中，故在测定血液肌酐时用血清和血浆较好。为去除假肌酐的影响，现在常用速率法来测定血肌酐。速率法亦称动力学方法，它是根据肌酐与碱性苦味酸形成复合物的速度与假肌酐不同，且肌酐的反应速度与浓度成正比的原理。如乙酰乙酸在20s内已与碱性苦味酸反应完成，其他多数干扰物则在80s后才与苦味酸有较快的反应，而20～80s之间主要是肌酐的反应。因此，血清与苦味酸混合后，分别读取510nm在20s及80s时的吸光度Ao和At，At-Ao除以间隔时间的值与肌酐浓度成正比，借标准液与样品同样测定即可求取样品中的肌酐量。现在速率法逐渐成为常规分析法，因为它不需去蛋白，方法简单、快速，可自动扣除血清及试剂空白吸光度。

(2)酶联法：肌酐经肌酐水合酶催化生成肌酸，肌酸与肌酸激酶、丙酮酸激酶、乳酸脱氢酶偶联反应，使NADH变成NAD^+，测量在340nm处吸光度的降低，其降低程度与肌酐含量呈正比例。此法特异性高，标本不需去蛋白，特别适用于自动分析。但工具酶过多、价格昂贵。

正常参考值：血浆肌酐44～133μmol/L。

血尿素浓度除受肾功能影响外，还受到蛋白质分解代谢引起的变化，如高蛋白饮食、胃肠道出血、口服类固醇激素等都可使血尿素浓度增高。而肌酐摄入、生成量恒定，故血肌酐测定较血尿素测定更能准确地反映肾小球功能，但反应较迟钝。

肾功能不全的代偿期可见BUN轻度增高(＞7.0mmol/L)，肌酐可不增高或轻度增高；肾衰竭失代偿期，BUN中度增高(17.9～21.4mmol/L)，肌酐也中度增高(442.0μmol/L)；尿毒症时BUN＞21.4mmol/L，为尿毒症诊断指标之一，肌酐可达1.8mmol/L。

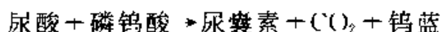
(三)血清尿酸测定方法

血清尿酸(serum uric acid，SUA)是嘌呤类的终末产物，血尿酸主要从肾脏排出，肾功能减退时尿酸增高。尿酸从肾小球滤过后在肾小管中重吸收和分泌，最后排出滤过量的8%，在严重肾衰竭时肾小管分泌大增，高达滤过量的85%SUA被排出，慢性尿毒症时SUA的增高程度不明显。

尿酸测定方法可分为两大类：磷钨酸还原法和尿酸酶法，目前以尿酸酶法为主。

1. 磷钨酸法　磷钨酸法是利用在碱性环境中尿酸具有还原性，无蛋白血滤液中的尿

酸可使磷钨酸还原生成蓝色的钨蓝，可进行比色测定，反应如下：



此法的不足之处是特异性不高，显色褪色速率变化不定，灵敏度低。

2. 尿酸酶法　尿酸酶测定方法有三种：

(1)紫外分光法：尿酸在 282～292nm 处有特异吸收峰，当其经尿酸酶作用后，产物在此波长范围无吸收峰，测量酶作用前后吸光度之差，经标准品、测定样品同时处理，可计算尿酸含量。该法灵敏度高，特异性强，其他物质无干扰，可用血清直接测定，不需沉淀蛋白，易于自动化，具有简单、快速的优点。

(2)酶联比色法：尿酸经尿酸酶作用生成的 H_2O_2，可用偶联的过氧化物酶(POD)使 H_2O_2 氧化还原色素原，成为氧化型而显色，用酚和 4 氨基安替比林作生色原。反应生成的红色醌亚类化合物，在 500nm 处有最大吸光度，吸光度的增加与样品中酸含量呈正比，可进行比色测定。此法敏感，反应所产生的颜色比用酚作色素原时产生的颜色强度大 4 倍，可用血清直接测定。

(3)酶联-紫外分光法：尿酸酶将尿酸氧化时生成 H_2O_2 同乙醇作用生成乙醛，后者被偶联的醛脱氢酶(ALDH)进一步氧化生成乙酸，伴随着 NAD^+ 变成 NADH，在 340nm 测定由 NAD 还原产生的光吸收增加与样品中尿酸含量成正比。此反应第一步是特异的，但后面的氧化还原反应易受干扰，因体内有许多脱氢酶反应，亦可氧化内源性底物而伴有 NAD^+ 还原生成 NADH，导致结果偏高。除以上方法外，固相酶技术的发展使测定更简单，更易自动化。尿酸酶的固相化有以下几种类型：①固相尿酸酶与氧电极相联，测定尿酸氧化时的耗氧量；②固相尿酸酶及过氧化物酶与显色法结合；③夹心固相酶荧光法，使产生的 H_2O_2 与对羟基苯乙酸反应产生荧光，此法具有酶反应的特异性及荧光法的灵敏度。

正常参考值：血尿酸：男性 148.7～416.4μmol/L，女性 89.2～356.9μmol/L。

(四) 肾小球滤过率放射性核素标记测定法

测定肾小球滤过率可以测某种放射性核素标记，例如 ^{51}Cr-EDTA、^{125}I 碘拉盐(iothalamate)或二乙撑三胺五乙酸(^{99m}Tc-DTPA)清除率，这些都是测肾小球滤过率的可靠的方法。目前，利用 SPECT 测定放射性核素标记物 ^{99m}Tc-DTPA 清除率是一种比较理想的 GFR 测定方法，其精确性很肯定。然而，它仍有如下缺点：①SPECT 机器庞大，搬动不便，故不能床边检测；②检测过程繁琐，检测时间长；③检测 1 次 Tc-GFR 费用较昂贵，经济困难者负担较重；④受测者需接受放射性。由于这些原因，放射性标记法只用在非常特殊的指征情况下和用于研究。

(五) γ-痕迹蛋白法(cystatin,C 法)

γ 痕迹蛋白也称为后 γ 球蛋白。分子量为 13kD，是胱氨酸蛋白酶抑制剂这一蛋白质大家族的成员之一。所有的有核细胞都能稳定地产生 γ 痕迹蛋白。它存在于所有的体液中。脑脊液中的浓度最高，尿中的浓度最低。γ-痕迹蛋白几乎完全被肾小球滤过，然后被肾小管吸收，紧接着被降解。因此，血浆或血清中的 γ 痕迹蛋白的浓度就由肾小球滤过率决定，γ 痕迹蛋白也就成为反映肾小球滤过率较好的一个标志物。肾衰会引起 γ 痕迹蛋白在血浆中的浓度升高 10 倍；近端肾小管功能失常会阻碍 γ 痕迹蛋白从肾小球超滤后的重吸收，同时尿中的 γ 痕迹蛋白浓度增加 100 多倍。

γ 痕迹蛋白是一个灵敏的和特异性的肾小球滤过率的标志物，不需要收集尿，目前为止无影响因素，是一种测定肾小球滤过率较好的方法。乳胶增强的 γ 痕迹蛋白是以多克隆兔抗体为基础的改良免疫比浊分析法。它以人尿中的纯 γ-痕迹蛋白定标，血清和加肝素的血浆都可用，分析时间短（约 6min）。在整个测定范围内，精确度较好。

（六）WCP 公式计算法

WCP 公式计算法是根据血清肌酐（SCr）推导出的计算 GFR 公式（WCP 公式）。公式如下：

$$WCP-GFR = 10^{[illegible]\,lgSCr}$$（SCr 单位为 μmol/L）

相似的公式计算法还有：测定尿素氮（BUN），以 Robert 公式测定 GFR；以 Cockcroft-Gault 公式计算内生肌酐清除率（CG-CCr）。公式如下：

$$Robert-GFR = 5.2 + 0.98 \times 100/SCr$$

（男，SCr 单位为 mg/dl）

$$Robert-GFR = 2.2 + 0.81 \times 100/SCr$$

（女，SCr 单位为 mg/dl）

$$CG-CCr = (140-年龄) \times 体重 \times 72^{-1} \times SCr^{-1} \times 0.85$$

（SCr 单位为 mg/dl）

WCP-GFR、Robert-GFR、CG-CCr 均能在一定程度上准确反映 GFR，而以 WCP-GFR 更准确，且简便、快速、安全而廉价，可代替 Tc-GFR 应用。

综上所述，目前测定肾小球滤过率和肾脏清除率的基本方法中，菊粉清除率因测定方法麻烦已基本不用，测定内生肌酐清除率是用的最多的方法，血清中的肌酐浓度也用来测定肾小球滤过率。然而，血清中的肌酐浓度和内生肌酐清除率都受许多内源性和分析时因素的影响，例如性别、年龄、体重、身高、营养、肾小管功能或者受胆红素、葡萄糖和一些药物的影响。放射性标记法精确可靠，但价格昂贵，只用在非常特殊的指征情况下和用于研究。γ 痕迹蛋白法和 WCP 公式计算法已证明是评价肾小球滤过率的快速、精确、简单的新方法，可在环境毒物的肾毒性研究中逐步推广。

四、肾脏的微穿刺和微灌注技术与应用

（一）肾脏微穿刺技术

1. 原理　在实验动物动脉中注入药物后药物随血液循环到达肾脏，在肾小球及肾小管中进行滤过、重吸收作用，此时用毛细管穿刺到肾小管中，从肾小管的不同节段直接收集小管液样品，研究化学物的重吸收率和电解质浓缩的变化情况，用于评价药物的代谢过程和作用机制。

2. 方法　大鼠肾小管易于作微穿刺，所以一般选大鼠作动物模型，大鼠体重在 250g 左右。实验前动物禁食 16h，但自由摄水，实验时将动物腹腔注射硫喷妥纳麻醉，置于恒温台上。切开大鼠气管，颈动脉和颈静脉插管分别用于测量血压、取血样和输注药物。左肾在侧切后小心的暴露出来，用棉絮包埋在一个小塑料容器内，用 37℃石蜡油做成油浴。输尿管插管并连续监测肛温，静脉注射 75μCi 溶于 0.7mlNaCl 溶液中的 ^{3}H 菊粉，然后以每 100g 体重 2.5ml/min 速度输注 0.85% NaCl 溶液。维持每小时灌输 ^{3}H 菊粉 75μCi。开始静脉内输注 45min 后，施行肾小管的对照穿刺，在显微操纵器和显微镜观察下用外

径8～10μm的毛细玻璃管从近曲小管和远曲小管直接收集小管液样品。远曲小管以静脉内注射丝胺绿鉴别。然后给予待测药物平衡30min后，再收集小管液，与对照期比较。

3. 应用　大鼠肾脏微穿刺技术主要应用于研究利尿剂对单个肾单位功能的作用，也有人用于研究利尿剂发生作用的主要肾小管节段的位置。在研究毒物在肾小球及肾小管滤过重吸收及分泌作用，以及肾单位的酸碱转运机制等方面也有较多应用。

(二) 肾脏微灌注技术

微灌注技术在肾脏方面的应用主要是离体肾小管的微灌注技术，离体肾小管的微灌注技术自Burg等1966年发明以来，已成功用于对几个种属的肾小管节段的研究。另外对肾脏小动脉微灌流，研究肾脏血流动力学的生理、病理生理机制，其方法基本相同。

1. 原理　肾脏微穿刺技术用于研究毒物对单个肾单位功能的作用，但肾小管不同节段，包括近曲小管、髓袢降支细段、髓袢升支细段、髓袢升支粗段、远曲小管、连接管、皮质集合管、髓质集合管、乳头集合管等有不同的功能特性。肾脏微灌注技术将肾小管不同节段分离、切割，对不同节段进行穿刺、灌注，从而鉴定影响肾脏清除率的药物的作用部位和作用机制以及作微穿刺研究。

2. 方法　将肾脏制成厚度<1mm的薄肾切片，在20～50倍目镜下，根据肾小管节段的解剖位置和形状，用尖锐的镊子或针切割分离。通常于4℃下，Ringer液中进行，不需加入蛋白酶。分离出的节段用转移吸管转移到灌注槽。灌注槽固定在倒置的显微镜的工作台上，通常灌注槽保持在37℃，水浴的灌注液也必需预加热到此温度。水浴灌注液依被研究的肾小管节段不同而不同，多数情况下含有HCO_3并充以CO_2。灌注用两套同心玻璃吸管进行，一套在灌注端，另一套在肾小管节段的收集端。也有用由一个小电动机控制前后运动。在灌注端使用4个同心吸管，最外边的一个吸管含有硅酮树脂并被驱动越过肾小管灌注端使此端密封。肾小管用一适当大小的支持吸管固定。肾小管被吸入吸管直到收缩。然后尖端直径小于灌注肾小管节段内径的灌注吸管被推入由支持吸管固定的肾小管节段。灌注吸管置于接近100cm的水压下以达到1～20ml/min的灌注速度。通常，当灌注吸管推进时瘪塌的小管腔张开。在管腔内推入吸管直到其在200～400倍镜下显示完整的肾小管节段。在管腔内，灌注吸管还包含一个液体交换吸管，通过它灌注液的成分可被迅速置换。肾小管节段的收集端被吸入到一根固定吸管，一硅酮树脂吸管被推进以封闭收集部位。收集部位的固定吸管内含有矿物油，通过油推进收集吸管，定量地收集由小管输注的灌注液。

3. 应用

(1)测定流量以确定毒物在肾小管不同节段的转运情况。小管收集速度可以通过恒定内径的收集吸管定时收集测定，水浴槽到管腔和管腔到水浴槽的单向流量对任一给定的物质都可以定量测定，从而可以确定渗透性。

(2)测定跨上皮电位以确定主动转运抑制剂的效应：灌注吸管可以连接电表的高阻抗输入，电压以浴槽接地，作参考测定跨上皮电位。由于浴槽与管腔中溶液相同，并且有高的腔内灌注速度(>10ml/min)，任何跨上皮电位必定是由主动转运势能引起，由此可以测定主动转运抑制剂的效应。

(3)研究特定小管节段的功能详细描述化学物的作用机制。

(4)膜片钳研究：在离体灌注的肾小管中，电极可以从未插管的一端进入管腔与膜的

刷状缘接触、利用膜片钳的全细胞模式使Na-丙氨酸共转运系统研究成为可能，从而获得抑制离子通道的化学物浓度反应曲线。

(5)研究肾小球的血流动力学：出球小动脉和入球小动脉在肾脏的血压调节中起关键作用 有人对分离的肾小动脉进行微灌流研究肾脏分泌的内源性物质对肾脏出球小动脉、入球小动脉的影响，从而了解肾脏的血流动力学机制。

五、电子探针显微分析法

电子探针显微分析技术(electron probe microanalysis，EPMA)又称电子探针X射线显微分析(electron probe x ray microanalysis)、X射线微区分析技术，是近四五十年发展起来的一门测试技术。其特点是：一方面用电镜观察样品的超微结构；一方而分析微小区域内的化学元素，并可对其进行定性定量分析。因此近年来该技术已成为生物医学科技工作者研究微量元素与生命科学关系的一种重要方法和手段。

X射线显微分析技术，是在电镜内先以高速细电子束(电子探针)轰击样品表面的微小区域，使该区所含元素各自发射出特征性X射线，利用电镜能谱仪与波谱仪检测装置查出其波长和能量，进而确定该区内元素的种类及其含量，接着与在相同条件下照射标准样品和同名元素所检测而获得的相应特征性X射线强度进行比较，经过某些修正，最后获得被测样品激发区域内各种元素的百分含量值或绝对含量值。

检测元素特征性X射线的方法主要有两种：一种是分析X射线波长的方法，也称波长散射型X射线微区分析法(wave length dispersive X ray microanalysis，WDX)，简称波谱分析法；另一种是分析X射线能量的方法，也称能量散射型X射线微区分析法(energy dispersive X ray microanalysis，EDX)，简称能谱分析法。EDX与WDX相比，具有以下优点：①EDX可在2～3min内对^{11}Na～^{92}U之间的元素进行快速同时显示式分析；而WDX分析速度较慢，需要20～30min，但可分析轻元素，从^{4}Be～^{92}U之间元素分析为逐次扫描式分析；②EDX敏感度为10^{-18}g，而WDX的敏感度仅为$10^{-1?}$g；③EDX仪器结构紧凑，重复性和稳定性好，而且不需要衍射晶体，没有聚焦要求，对样品表面发射点的位置没有严格限制，工作效率高。EDX的能量分辨率较WDX为低，其定量分析精度较差，对原子序数低于^{11}Na的轻元素分析较为困难；EDX的固态检测器必须保持在液氮低温状态，即使是在仪器不工作状态也不能中断，否则检测器内锂的浓度分布状态将因扩散而变化，使仪器功能遭到破坏。两种谱仪各有优缺点，可以相互补充，但波谱仪一般只安装在扫描电镜或电子探针仪上，而对生物医学薄样品来说，用安装在透射电镜上的能谱仪进行定性和定量分析是较为合适的。

K^+、Na^+、Ca^{2+}等离子在细胞生理中起着重要的作用，这些离子的改变可能是很多疾病的病理生理机制之一。由于电子探针微量分析技术可以在亚细胞成分中测量元素成分，所以近年来这门技术在生理、病理上的应用已经越来越广泛。很多金属元素都有肾脏毒性，可利用电子探针显微分析法对金属元素的肾脏毒性进行研究。同时由于电子探针微量分析法在元素的定量分析上的优势，也可以将这一方法用于毒理学危险度评定和安全性评价。

电子探针显微分析在肾脏研究中的优点在于微区域、微量，可以在亚显微水平对组织细胞进行分析，检测极限可达100ppm；简便、快速，现在的电子探针一般都配备了电子计

算机，可以实现数据处理自动化，能谱法在5min内就可完成；适用范围宽、准确度高，对样品含量在1%以上的组分，电子探针分析的相对误差在1%～2%以内；有多种分析方式，可进行表面形态分析、定性分析、定量分析、线分析和面分析；不损坏样品，样品分析以后，可以完整地保存和继续进行其他方面的测试。

电子探针显微分析法关键是样品的制备，如何能够在制备过程中尽量好的保存生物样品的原有结构，并不出现或尽可能少出现元素的丢失和掺入在实际工作中有一定的困难。

第二节 体外试验

体外研究的方法可以提供主要诱发机制以及细胞生存效应的信息，以确定化学物的肾毒性（包括所引起的结构和功能改变，代谢产物的形成，排泄量，毒物动力学）。化学物导致的肾毒性效应可由化学物本身引起的或是由其代谢产物引起的。然而，在一些情况下，化学物或代谢物需要在作用部位进一步代谢以形成最终的肾毒性物质。在整体内因为绝大多数化学物会在肝脏进行代谢，所获得的资料评价肾毒物在作用部位的代谢非常困难。

一、体外细胞培养与细胞毒性试验

用肾细胞培养研究肾毒性有很多好处。肾实质细胞有明显的异源性，用组织培养很难得到特殊的细胞，而细胞培养能对特殊细胞进行研究；甚至可能测定对人体组织的毒性；特别是可以在最大限度地控制实验环境的条件下，研究毒物对肾细胞的毒作用。

常用的肾细胞株有MDCK、LLC PK1和OK，可以购买到，也很易培养。由于这些细胞株来源不明确，几经转手已经改变了某些原有的性状，还不够理想，但适合用于细胞培养。所以应该注意这些细胞株可能有些不同性状的亚型，在应用中也应关注这些细胞株的性状，给予一定的描述。

MDCK是来自狗的肾脏，近似于集合管和远曲小管，也具有一些与这些细胞正常时无关的性状。LLC-PK1来自猪的肾脏，在一定的条件下有近曲小管的特性，能进行钠依赖性葡萄糖转运，不能进行某些氨基酸的转运。LLC PK1细胞对抗利尿激素有强烈的反应。OK细胞株与LLC PK1细胞相似，有近曲小管细胞的特性。有糖、氨基酸和有机离子的代谢能力，但对抗利尿激素无反应。

原代培养细胞可以克服细胞株的缺点。虽然有时不太能确定是何种细胞。但是在分离细胞时，可根据肾单位的解剖位置，正确地切取特殊的肾单位片段，以期获取特殊的细胞。当然，这样操作上比细胞株要困难。

原代培养需要解决观察时程的问题。用梯度离心的方法可以将近曲小管细胞与远曲小管细胞分开，但需要有些片段的生化参数来确定这些细胞的特性。当然培养基和培养条件，可以提供不同的细胞生长条件，如近曲小管需要有生理浓度的糖和胰岛素，培养时需要氧气。

二、肾膜囊泡的分离与应用

肾小管细胞刷状缘和基底侧的肾膜囊泡可以用来研究分子跨上皮转运的机制，也可

以用来理解肾小管细胞刷状缘膜和基底侧膜对毒物敏感性的差异。肾小管细胞刷状缘和基底侧的肾膜囊泡(membrane vesicles)的分离,可以用不同的密度梯度离心法或离子沉淀法。操作方法需要进行几个小时,一般4～5h;另外肾小管刷状缘和基底侧的肾膜囊泡相互污染也是不可避免的;还有分离得到的囊泡膜面的朝向问题,是外膜朝外,还是外膜朝内。研究电解质或其他因子的转运,可以先分离肾小管刷状缘和基底侧的肾膜囊泡,然后在培养液里加受试物;或整体动物染毒,然后分离肾小管刷状缘和基底侧的肾膜囊泡,测定毒物毒性。

（金泰廙）

第十一章

心血管毒理学研究方法

目前在心血管毒理学研究工作中，除了应用毒理学本身的技术和方法，还大量采用了细胞生物学、免疫学、遗传学、分子生物学、基因组学、医学影像学以及流行病学技术和方法。流式细胞技术、心肌原代细胞培养技术、激光共聚焦扫描显微技术、免疫组织化学技术和原位杂交技术为从组织细胞层面研究心血管毒物对心肌及血管系统的损伤提供了强有力的工具。

第一节 心血管毒理学动物实验研究方法

心脏毒性的动物实验研究可以利用正常动物、病理状态的动物和转基因动物，在方法学上有待于发展和标准化。

（一）利用正常动物

在常规的毒性研究中的动物可进行多种心血管毒性检查，包括血压、心率和心电图等。利用脉冲流量计测定的血流速是评价心血管系统功能有用的指标。在机体特定部位（如结膜和视网膜）或置于动物皮下的微血管室可研究动脉、毛细血管和静脉的状态。同时，心肌和血液的生化测定对评价心血管毒性是有意义的。

在尸体解剖时，测定器官重量。大体解剖、光镜和电镜检查具有重要的价值。在组织病理学研究中，除常规HE染色方法外，根据研究需要还可对组织标本做特殊处理。心肌的变性、坏死等病理改变可用HE染色方法分析，也可用特殊染色分析。心肌细胞轻度的颗粒变性主要是线粒体的肿胀和变性，HE染色胞浆中出现嗜伊红颗粒。颗粒变性可进一步发展成肌原纤维变性，出现肌原纤维过度收缩，发生凝集、断裂以及不规则颗粒或团块，并呈嗜伊红浓染，说明这时心肌细胞进入坏死阶段。心肌脂肪变性可用苏丹Ⅲ、苏丹Ⅳ、苏丹黑B、油溶红O和锇酸染色。心肌粘液变性在HE染色呈浅蓝色，PAS染色阳性，甲苯胺蓝、天青A和硫堇等染色呈异染性反应。结缔组织和胶原纤维及弹力纤维也可通过特殊染色方法显示心肌的病理改变过程。在心肌损伤的早期，光学显微镜下不易发现形态学改变，可采用电镜方法检查亚细胞水平改变，也可采用荧光染料在荧光显微镜下检查。必要时，还可应用免疫组织化学方法及原位杂交技术等。

（二）利用病理状态的动物

在常规的毒性试验中不易检测到化学物的心脏毒性。例如，钴和蒽环类抗生素的心脏毒性首先在人体观察到后，才在动物实验中得到重复。在常规的毒性试验中的阴性结

果不能排除潜在的心脏毒性。需要以特殊的试验方法来证实心脏毒性。

这些方法通常为：①模拟临床条件。例如蒽环类抗生素必须间断给药才诱导心脏毒性，而持续给药则动物在心脏毒性发生之前就死于其他毒性作用。在急性试验中可检测肾上腺能受体拮抗剂的毒性，长期给药的毒效应可为耐受所掩盖。当动物饲以缺乏蛋白质和维生素的饲料时更易观察到钴对心脏的毒性。②利用病理状态的动物，如饲以含2%胆固醇饲料的兔，心脏有动脉粥样硬化，对心肌缺血更为易感。也可使用其他模型，如心肌梗死、患有心肌病的地鼠、高脂血症、与药物的交互作用等。

（三）利用转基因动物

目前用于心血管毒理学研究的转基因动物种类较多，动物主要选择小鼠和大鼠，导入的外源基因涉及心肌肥大相关基因、心肌传导过程相关的受体基因、原肌球蛋白基因、激酶及代谢酶基因、血管紧张素基因、白细胞介素基因和金属硫蛋白等基因，通过建立相关基因的基因敲除或在心脏特异性高表达的转基因动物模型来研究基因功能、调控过程以及心血管毒性作用机制和拮抗机制。

第二节 心功能评价方法

在对人类心血管疾病的诊断和研究中，心功能评价方法已有了很大的发展。目前，在动物实验中除已进行了心电图检查外，其他方法还有待于开发。

（一）心电图

心电图技术可用于人体和动物。心电图记录的波形反映心房去极化（p 波）、心室去极化（QRS 波）和心室复极化（T 波）过程。各波形之间的时距对反映心功能改变也十分重要，P-R 间期代表房室传导时间；ST 间期代表从 QRS 波到心室复极化时间；QT 间期代表心室去极化到复极化时间。因此，心电图检测可以反映心律失常、传导阻滞、心肌局部缺血、心肌肥大、冠状动脉功能不全及其他心肌损伤。

（二）心向量图

心肌除极和复极的每一瞬间电位变化可以用向量表示，称为瞬间综合心电向量或瞬间向量。心向量图与心电图之间的关系可简单概括为某个导联上的心电图是心电向量图在该导联上的投影。心向量图的基本图形包括 P 向量环、QRS 向量环和 T 环。P 向量环是心房除极过程中瞬间向量的轨迹；QRS 向量环是心室除极过程中瞬间向量的轨迹，也是心向量图观察的重点；T 环为心室复极过程瞬间向量的轨迹。

（三）心排血量

心排血量指每分钟心室泵出的血量，是评价心脏功能的一个基本指标。心排血量取决于心率和每搏量，也就是说心排血量等于心率乘以每搏量。但由于每搏量不易常规测得，所以实际工作中心输出量一般通过多普勒超声技术或示踪技术测定。成人正常心排血量平均为 5L/min，机体自身可以调节心排血量，在运动或系统紧张状态下，心排血量可成倍增加。离子稳态的改变、传导障碍以及心肌收缩能力的变化都会影响心排血量。

（四）心阻抗血流图

心阻抗血流图又称心阻抗图或阻抗心动图，其检测原理是基于生物体容积变化引起的相应电阻抗变化，是一种反映心脏功能变化及心脏血流动力学改变的无创性检测方法。

生物体内容积变化主要是由血液流动造成的，从胸部获得的阻抗变化主要是主动脉、心脏容量及肺灌注等因素综合作用的结果。容积的变化引起相应电阻抗变化，记录这种电阻抗改变，就可间接推测血流情况，了解心脏血流动力学改变。

引起心阻抗变化除血流动力学因素外，血液理化性质变化也可直接导致心阻抗图改变。尽管心阻抗图变化受多种因素影响，但心阻抗图法与其他心功能检测方法有良好的相关性，不失为简单、无创和有效的心血管功能检测方法。

（五）超声心动图

超声心动图是一类超声影像学技术，包括M型超声心动图、二维超声心动图、脉冲多普勒超声心动图、连续多普勒超声心动图和彩色多普勒显像。超声心动图心功能测定是无创伤和无痛苦的间接检测，与其他无创性心功能检测方法相比，超声心动图法具有重复性好，准确性高的特点，它既能显示心血管病理解剖变化，又能显示心血管病理生理改变。

近年来，超声心动图与血管内超声显像、血管腔内多普勒血流测定以及血管造影等侵入性技术相结合，可以分析整段血管的切面图像，不仅显示血管管腔，而且可以显示管壁结构、厚度及其他形态学改变，从而对心血管结构功能有了更全面的了解，尤其为介入性治疗提供了新的手段。

（六）磁共振技术

磁共振（NMR）指核磁矩不为零的核在外磁场作用下，核自旋能级发生塞曼分裂，共振吸收某一特定频率射频辐射的物理过程。由于塞曼分裂及共振吸收与分子化学结构有密切关系，因此，磁共振技术广泛应用于生物大分子的结构分析及构效研究。目前，磁共振成像技术已经成为医学影像学的重要组成部分，成功地用于心脏及大血管疾病的研究，成为心肌梗死、原发性心肌病、继发性心肌损害、心包疾患、心脏及心包肿瘤、先天性心脏病、心脏瓣膜病及大血管疾病的辅助诊断方法。磁共振成像技术在医学影像学手段中对软组织分辨率最高，可以区分心内膜、心肌、心外膜及心包。不同于X射线和放射性核素显像的检测技术，磁共振技术属于无创伤性技术，并且分析参数多，提供信息量大，具有任意方向断层能力，可以全面显示被检测器官或组织结构，具有较高的空间分辨率。

第三节　心脏毒性体外评价方法

近年来对心脏毒性的体外评价方法有了较大的发展。离体灌注心脏是常用于研究药物对心收缩强度和速率、冠脉血流速影响的模型，也可用于检测毒物对心脏的作用，例如，已证明某些卤代烃在兔离体灌注心脏抑制左心室峰压和左心室峰压增加的速率。而且，离体的心房和培养的心肌细胞也用于心脏毒性研究。对培养的心肌细胞在外源化学物毒作用进行深入的机制研究还可利用激光共聚焦扫描显微技术。

一、心肌细胞原代培养

1. 大鼠心肌细胞原代培养

(1)取出生1～2天的SD大鼠，以0.05%异戊巴比妥钠腹腔麻醉，皮肤消毒。

(2)打开胸腔，取大鼠心脏心尖部组织，冷PBS冲洗、剪碎。

(3)0.1%胰酶于35℃水浴搅拌消化10min，弃上清，重复消化，收集细胞悬液。

(4)加适量含小牛血清的培养基，终止胰酶消化。

(5)4℃ 100g 离心 7min，弃上清。

(6)用含 20%小牛血清的 DMEM(pH7.2)制备细胞悬液。

(7)差速贴壁分离法纯化心肌细胞。

(8)细胞悬液 37℃ 培养 50min，经 200 目不锈钢网过滤，除去未消化组织及细胞团块。

(9)细胞悬液按 1×10^5 密度接种于培养瓶中。

(10)苔盼蓝染色检测细胞成活率，显微镜下观察细胞形态。

2. 小鼠心肌细胞原代培养

(1)出生 1～3 天小鼠，脱臼处死。

(2)取小鼠心室，置于无 Ca^{2+} 及 Mg^{2+} 的冷 Hanks 盐缓冲液(HBSS)中。

(3)用 HBSS 冲洗 3 次。

(4)将心肌剪碎，洗涤 2 次。

(5)加入 0.25%(W/V)胰酶，37℃、5% CO_2 培养 15min。

(6)首次消化后加等体积无 Ca^{2+}、Mg^{2+} 的冷 HBSS，再加胰酶消化 4～5 次。

(7)200g 离心 8min，将细胞重新悬浮于 FBS-MEM 溶液，加入青霉素(100U/ml)及链霉素(100μg/ml)。

(8)为去除非心肌细胞，可将细胞在 FBS-MEM 中，37℃、5% CO_2 的水饱和气预培养 2h。

(9)收集细胞悬液，细胞密度调至 1×10^5，在上述条件下培养 24h。

(10)24h 后更换培养基，使心肌细胞贴壁生长，然后每 3 天重复更换培养基。

二、细胞增殖试验

(一) ^{3}H-TdR 掺入法

具有增殖能力的细胞可经丝裂原 ConA 或 PHA 激活进入细胞周期进行有丝分裂，当细胞进入 S 期后，合成 DNA 增加。培养液中加入 ^{3}H-TdR 后，^{3}H-TdR 被作为合成 DNA 的原料摄入细胞，掺入到新合成的细胞 DNA，故此法称为 ^{3}H-TdR 掺入法。^{3}H-TdR 掺入量可由液体闪烁谱仪测定，并推算出受试细胞对受试物的应答水平和细胞增殖程度。

具体实验步骤：

(1)无菌制备细胞悬液。

(2)用细胞培养液洗涤细胞，将细胞浓度调至 1×10^6/ml。

(3)将细胞悬液加至微孔培养板，每样品 3 复孔，每孔 0.1ml，加 ConA 0.1ml。

(4)CO_2 孵箱内 37℃ 培养 24h，每孔加入 0.3～0.5μCi ^{3}H-TdR(370kBq/ml 终浓度 11.1～18.5kBq)，继续培养 6h。

(5)用多头细胞收集器将各孔培养物收集于 49 型玻璃纤维滤膜上，去离子水冲洗滤膜，自然干燥。

(6)将滤膜放入液闪测定瓶内，每瓶加 3～5ml 闪烁液，用液体闪烁谱仪测定。

结果判定：取 3 复孔测定 CPM 平均值，进行统计学处理

刺激指数(SI)＝ConA 刺激 CPM 均值/对照孔 CPM 均值

(二) MTT 比色法

四甲基偶氮唑蓝(MTT)为浅黄色,能作为底物被活细胞中线粒体脱氢酶分解成蓝紫色的非水溶性化合物甲臜,所形成的甲臜量与细胞增殖程度成正比,采用分光光度法进行比色分析,即可推测细胞的增殖程度。由于此法不需特殊设备,不使用放射性核素,具有简便、经济、安全的特点,因而被广泛使用。

具体实验步骤:

(1)无菌制备细胞悬液。

(2)用细胞培养液洗涤细胞,将细胞浓度调至 1×10^6/ml。

(3)每孔加入0.1ml细胞悬液,每个样品3复孔,37℃培养24h。

(4)每孔加入0.01mlMTT溶液,继续培养4h。

(5)每孔加入0.1ml酸性异丙醇,使甲臜溶解成均匀的蓝色溶液。

(6)使用酶标仪于570nm处进行比色分析。

结果测定:取3复孔吸光度值的平均值进行统计处理

刺激指数(SI)=受试组OD均值/对照组OD均值

三、DNA含量及细胞周期分析

具体实验步骤:

1. 制备单细胞悬液。

2. 用无 Ca^{2+} 及 Mg^{2+} 的冷Hanks盐缓冲液(HBSS)离心洗涤两次,1000r/min离心5min(下同)。

3. 细胞浓度调至 2×10^6/ml,取1ml细胞悬液,注入7ml 70%冷乙醇,4℃条件下固定24h。

4. 用HBSS离心洗涤两次,除去固定液。

5. 取250μl细胞悬液,加入等体积RNA酶,37℃消化30min。

6. 离心洗涤2次,再于250μl细胞悬液中加入等体积PI染液,4℃染色30min。

7. 流式细胞仪分析DNA含量及细胞周期。

第四节 细胞凋亡与坏死检测

细胞凋亡(apoptosis)是受基因调控的一种主动性、程序性细胞死亡,是机体维持细胞稳定和生理平衡的一种机制。目前,用于细胞凋亡与坏死的检测方法较多,包括形态学方法、酶联免疫方法、流式细胞法和琼脂糖凝胶电泳法,下面简要介绍其中部分方法。这些方法适用于多种体外培养细胞凋亡与坏死的检测。

一、形态学测定方法

这类方法主要依据细胞凋亡及坏死发生的形态学改变,借助细胞涂片,超薄切片和染色等手段,利用普通光学显微镜,荧光显微镜或电子显微镜进行观察分析。

(一)普通光学显微镜检测

主要操作步骤:

(1)根据检测需要制备细胞悬液。

(2)细胞悬液1 00r min离心10min,弃上清,将细胞重新悬浮于PBS中,将细胞浓度调至1×10° ml。

(3)取50~100μl细胞悬液均匀涂在载玻片上,有条件可采用离心涂片机涂片,涂片后室温干燥,甲醇固定5min。

(4)在玻片上滴加苏木精染液,室温染色1min,用水轻轻洗去染液。

(5)在含体积分数1%盐酸的80%乙醇中分化10s,冲洗玻片,干燥,封片。

(6)光学显微镜下观察凋亡及坏死细胞形态,凋亡细胞皱缩,细胞膜完整,染色质聚集,嗜碱性增强,染成深蓝色并成环状或新月状附在核膜周边,细胞核固缩,核膜消失,碎裂形成圆形凋亡小体。坏死细胞体积增大,染色质稀疏成网状,嗜碱性减弱,染成淡蓝色,细胞核破碎,细胞膜不完整。

(二)荧光显微镜检测

主要操作步骤:

(1)制备荧光染料,10mg吖啶橙混于100mlPBS中,过滤,4℃避光保存。

(2)制备细胞悬液,将细胞浓度调至1×10 ml。

(3)取95μl细胞悬液,5μl吖啶橙染液混匀。

(4)吸取1滴上述混合液滴于载玻片,干燥、封片。

(5)荧光显微镜下观察细胞形态,正常细胞DNA呈黄色或黄绿色均匀荧光;胞质和核仁RNA为橘黄或橘红色荧光,甚至可见黄绿色碎片;坏死细胞胞质内黄绿色或橘黄色荧光均减弱甚至消失。

(三)电子显微镜检测

主要操作步骤:

(1)4℃离心收集细胞,PBS冲洗2遍。

(2)5ml PBS重新悬浮细胞,细胞浓度调至1×10⁶ ml。

(3)将细胞悬液滴入制备好的有琼脂空槽的离心管内。

(4)4℃ 800~1000r min离心10min。

(5)取出离心管内琼脂,仔细切下含有细胞团的琼脂部分。

(6)将切下的琼脂置于戊二醛固定液内,4℃固定2h以上。

(7)0.1mol L PBS缓冲液冲洗。

(8)10g L锇酸固定2h。

(9)经脱水、渗透、包埋、超薄切片、染色等步骤常规制备电镜样品。

(10)透射电镜下观察细胞形态及细胞器结构,凋亡细胞染色质固缩,聚集在核膜周围,呈新月状或环形小体,细胞浆浓缩,凋亡晚期细胞核碎裂产生凋亡小体;坏死细胞染色质稀疏呈颗粒状分布,边界不清,细胞肿胀,细胞器结构破坏,膜结构不完整。

二、琼脂糖凝胶电泳方法

发生细胞凋亡时,由于DNA断裂和核小体形成,出现180~200bp或其整倍数的寡聚核苷酸,电泳上表现为梯状电泳条带(DNA Ladder)。利用凝胶电泳方法测定该条带可检测细胞凋亡。

具体操作步骤:

(1)制备细胞悬液,将待测细胞用PBS冲洗1遍。

(2)用1.5ml Eppendorf管离心沉淀$1\times10^6\sim2\times10^6$个细胞,弃上清。

(3)加入50μl细胞裂解液(Tris HCl pH8.0 10mmol/L NaCl 10mmol/L EDTA 1mmol/L 蛋白酶K 100mg/L SDS 10g/L),混匀,于37℃水浴恒温至细胞裂解混合液变清。

(4)室温下12000r/min离心5min,将上清液转移至另一个离心管中。

(5)向上清中加等体积的提取液(酚:氯仿:异戊醇=25:24:1)抽提1次。

(6)等体积氯仿抽提1次。

(7)上清液中加入1/10体积3mol/L醋酸钠和2倍体积冷乙醇,-20℃沉淀过夜。

(8)4℃ 12000r/min离心10min,弃上清。

(9)室温晾干样品,加入20μlTE缓冲液和1μl RNA酶,37℃恒温1h。

(10)加入4μl含溴酚蓝的样品缓冲液混匀,将样品加入含0.5g/L溴化乙啶的1.8%琼脂糖凝胶。电泳1~2h后,紫外线灯下分析电泳结果:正常细胞电泳后只出现一条滞留于加样孔附近的大电泳条带。凋亡细胞出现排列为梯状的多个条带,坏死细胞信号弥散,没有明显条带。电泳信号可用图像分析系统进行量化。

三、酶联免疫分析方法

在细胞凋亡早期,只有少数细胞出现DNA断裂。而且如果断裂DNA片段较大,用电泳方法难于观测到明显的DNA梯状条带。在这种情况下应用抗组蛋白和抗DNA单克隆抗体酶联免疫法(ELISA)可进行凋亡检测。该方法具有定量分析,不需标记细胞,灵敏度高等优点,适合于大样本量检测。

具体操作步骤:

(1)制备细胞悬液。

(2)1500r/min离心5min,弃上清,将细胞重新悬浮于1ml培养液,再离心,弃上清。

(3)细胞重悬于细胞裂解液中(Tris-HCl pH8.0 10mmol/L NaCl 10mmol/L EDTA 1mmol/L 蛋白酶K 100mg/L SDS 10g/L)4℃裂解10min。

(4)1500r/min离心15min,吸取上清液,与细胞裂解液混合(1:10)用于酶标测定。

(5)酶标板中每孔中加入100μl包被缓冲液(抗组蛋白抗体1ml 0.1mol/L碳酸钠缓冲液pH9.2 9ml)室温包被4h或4℃包被过夜。

(6)去除包被缓冲液,每孔加入200μl细胞裂解缓冲液,室温封闭30min。

(7)去除裂解缓冲液,每孔加入200μl封闭缓冲液(0.05% Tween 20 1mmol/L EDTT 0.25% BSA 0.5g/L NaN_3)室温封闭30min。

(8)每孔加入洗涤缓冲液(含0.5g/L NaN_3的PBS溶液)冲洗3次。

(9)每孔加入100μl待测样品溶液,另设两孔只加细胞裂解缓冲液作为空白对照,室温孵育90min,以洗涤缓冲液小心冲洗3次。

(10)除空白对照孔外,每孔中加入100μl酶标记DNA抗体溶液,室温孵育90min,以洗涤缓冲液小心冲洗。

(11)每孔中加入100μl底物缓冲液,室温避光反应10~20min,以底物缓冲液为对照,酶标分析仪450nm波长测定各孔光密度值。

(12)结果分析:待测样品3复孔光密度平均值减去本底光密度值代表死亡细胞数目,凋亡细胞以富集系数(EF)表示,EF值代表释放到胞浆中的核小体或寡聚核苷酸的多少。计算公式为EF (待测样品光密度值－本底光密度值) 阴性对照光密度值

四、流式细胞仪检测方法

荧光染料Hoechst33342(HO)可透过膜结构,使活细胞及凋亡细胞的DNA染色。带电荷的碘化丙啶(PI)则只能使坏死细胞着色。经适当波长的紫外光激发两者可分别产生蓝色荧光和红色荧光,通过流式细胞仪分析,据各类细胞光反射性质的不同可对活细胞、坏死细胞及凋亡细胞进行定量分析。细胞荧光染色可采用PI单染色和HO双染色方法。凋亡细胞在等渗条件下染色,细胞吸收HO能力增强。在活细胞中加入HO,凋亡细胞会产生较强蓝色荧光,其强度比坏死细胞和凋亡细胞大得多。因此,先进行HO活细胞染色,再进行PI染色,凋亡分析效果会更好,而且还适用于不发生DNA断裂的凋亡检测。

具体操作步骤:

(1)制备样品单细胞悬液。

(2)将10^5～10^6个细胞悬浮于1ml培养基中,加入10μl浓度为100mg L HO溶液,混匀。

(3)37℃下温育5～15min。

(4)将细胞置于冰上冷却,4℃ 离心,弃上清。

(5)将细胞重悬于1ml PBS溶液中,加入5μl浓度为1g L的PI染液,混匀。

(6)采用流式细胞仪进行分析,根据凋亡细胞及活细胞蓝色荧光强度,坏死细胞红色荧光强度及各类细胞光散射能力差异,由计算机进行定性定量分析。

(孙志伟)

第十二章

皮肤毒理学研究方法

第一节　皮肤刺激/腐蚀试验

皮肤刺激是指皮肤涂敷受试物后产生的可逆性局部炎性反应(无致敏淋巴细胞或抗体参与)。皮肤腐蚀指皮肤涂敷受试物后产生的局部不可逆性组织损伤。

一、动物皮肤刺激试验

(一) 试验方法的原则

受试物应以一次或多次涂(敷)于健康的无破损的皮肤上;每种受试物至少要用4只健康成年动物(家兔或豚鼠);试验均采用自身对照;受试物使用浓度,一般情况下,液态受试物采用原液或预计人应用的浓度。固态受试物则用水或合适赋形剂(如花生油、凡士林、羊毛脂等),按1∶1浓度调制;凡具有高度皮肤毒性,或pH<2或pH>11.5的化学物质,均不进行本项试验。

(二) 动物的准备

选用两种性别成年家兔或豚鼠,首选家兔。动物体重范围为家兔2.0~3.0kg,豚鼠35、~450g。实验动物应在动物笼内观察3~5天,使其适应环境,并观察其健康状况。正式给药前24h将动物背部脊柱两侧毛发剪掉或用脱毛剂去掉,注意不要擦伤皮肤。受试物涂抹处,不应少于动物体表面积的10%。

(三) 受试物的配制

若受试物是固体,应磨成细粉状,并用适量水或无毒无刺激性赋形剂混匀,以保证受试物与皮肤良好的接触。常用的赋形剂有橄榄油、羊毛脂、凡士林等。若受试物是液体,一般不必稀释。受试物为强酸或强碱pH值<2或≥11.5,可不再进行皮肤刺激试验。

(四) 一次皮肤涂抹(急性皮肤刺激)试验

试验前24h,将实验动物背部脊柱两侧毛剪掉或脱掉,不可损伤表皮。去毛范围为左、右各约3cm×3cm。将受试物0.1ml(g)直接涂在一侧皮肤上,然后用2.5cm×2.5cm的两层纱布和玻璃纸或类似物覆盖,再用无刺激性胶布和绷带加以固定。另一侧涂赋形剂作为对照。敷用时间一般为4h,亦可一次敷用24h。试验结束后用温水或无刺激性溶剂除去残留受试物。于除去受试物后的1、24和48h观察涂抹部位皮肤反应,按表12-1和表12-2进行皮肤反应积分和刺激强度评价。

观察时间应以观察到可逆或不可逆刺激作用的全过程为准,一般不超过14天。

表 12-1　皮肤刺激反应评分

红斑形成	积分
无红斑	0
勉强可见	1
明显红斑	2
中等～严重红斑	3
紫红色红斑并有焦痂形成	4
水肿形成	
无水肿	0
勉强可见	1
皮肤隆起轮廓清楚	2
水肿隆起约 1mm	3
水肿隆起超过 1mm，范围扩大	4
总分	8

表 12-2　皮肤刺激强度评价

强度	分值
无刺激性	0～0.4
轻刺激性	0.5～2.9
中等刺激性	3.0～5.9
强刺激性	6.0～8.0

(五) 多次皮肤刺激试验

先将实验动物背部脊柱两侧皮肤的毛剪掉或剃掉，去毛范围各为 2.5cm×2.5cm。取受试物 0.1～0.5ml(g)涂抹在一侧皮肤上，另一侧涂赋形剂作为对照，每天涂抹 1～2 次，连续涂抹 14 天。每次涂药前应剪毛，不得损伤皮肤，保证受试物与皮肤充分接触。

每天观察皮肤反应，按表 12-1 评分。

按下式计算每天每只动物平均积分，以表 12-2 判定皮肤刺激强度。

$$\text{每天每只动物平均积分}=\sum\left(\frac{\text{红斑和水肿总积分}}{\text{受试动物数}}\right)/14$$

(六) 结果评价

按上述评定标准和指标的最高分值判断受试物的皮肤刺激作用的有无或刺激的强弱。在许多情况下，家兔和豚鼠对刺激物质较人敏感，从动物试验结果外推到人可提供较重要的依据。

二、人体皮肤刺激试验

如果受试物体内毒性(皮肤吸收)低，可考虑对志愿者进行皮肤刺激预测试验。虽然

管理机构一般不要求进行人体试验，但由于物种间外推的不确定性，人体试验在一些情况下优于动物试验。未知或不熟悉组成的新化学物，应当首先进行动物试验，保证人使用安全。斑贴试验反应一般1周左右即可愈合。如果反应较重，应进行相应的治疗处理。严重的反应可能在反应部位会出现色素沉着。

（一）一次性刺激斑贴试验

一次性刺激斑贴试验（single-application irritation patch tests）有多种方法，下述为美国国家科学院（National Academy of Sciences）提出的方法。

贴片置于背部两肩胛骨之间或上肢背侧，外科胶布固定。对一些新的挥发性物质，应使用相对透气性胶带。暴露时间一般为4h，如果测试新的物质或挥发性物质时间可缩短至30min～1h，有必要时可将暴露时间延长至24～48h。如果受试者感到不舒服，可立即撕去贴片。到达规定的暴露时间时，撕去贴片，清水洗去残留的物质。分别在贴片撕去1h、24h后，观察受试部位的反应。反应强时观察时间可延至3～4天。表12-3为人体刺激反应评价等级。每位受试者可同时测试多达10种的受试物，不同的部位，皮肤刺激反应也不同，所以试验中贴片的部位也应该一致。试验中应至少包括一个阳性对照组。求出试验组和对照组的平均分值，进行比较。

表12-3　人体斑贴试验分级

A　简单的贴片试验分级

0　正常皮肤

±　受试部位散在可疑红斑

1　明确的红斑

2　红斑和硬结

3　小水疱

4　大水疱

B　详细的贴片试验分级

0　无明显的皮肤反应

0.5　微弱的极轻微的红斑或轻微干燥

1　明确的微弱红斑，无丘疹或破损；或无红斑，但皮肤明确干燥；可能有表皮裂伤

1.5　清晰的红斑或明确的干燥和微弱红斑；可能有表皮裂伤

2　中度红斑，可能有少数丘疹或深度裂伤，龟裂处可见中度至重度红斑

2.5　中度红斑且可觉察极轻微的水肿。或重度红斑（贴片周边的晕状反应属贴片本身导致），可能有少数丘疹。或中度至重度水肿

3　重度红斑、甜菜红），可伴有不规则的丘疹。或中度至重度红斑并有轻度水肿（高于周边皮肤）

3.5　中度至重度红斑并具有中度水肿、局限于贴片部位）。或中度至重度红斑并具有孤立的焦痂或囊泡形成

4　不规则的囊泡。或焦痂。或中度至重度红斑并且或水肿超出贴片范围

表 12-4 划痕试验分级

0	几乎不能觉察到抓痕
1	红斑仅限于抓痕部位
2	红斑带较宽，有或无小囊疱、脓疱或糜烂
3	严重红斑，有或无与其他损伤部分融合
4	融合、严重红斑，有时水肿、坏死或大疱

（二）多次刺激斑贴试验

皮肤疲劳是指致敏试验无反应，但诱导晚期却出现皮肤炎性病变。这种现象也称为累积刺激或继发刺激。现在常用的有21天累积刺激试验（the cumulative irritation assay）、小室划痕试验（the chamber scarification test）和肥皂小室试验（soap chamber tests）。

21天累积刺激试验方法：用受试液或0.5g的粘性受试物将约6.5cm²的衬垫饱和，贴于上背，胶布固定。24h后撕去贴片，观察局部的反应，然后再换上新的贴片。每天一次，共21天。受试者10至24人，增加受试人数可提高试验的敏感性。计算IT_{50}评价比较受试物的刺激性。

对该方法进行的改进为：①试验时间，虽然该试验称为21天累积刺激试验，但实际可根据需要选择不同的时间。受试物为婴幼儿洗涤剂，最长观察21天；表面活性物质，选择10天；剃毛乳膏或香皂，每天5～6h或17～18h，共4天。②评价，以积分法替代IT_{50}。

多次刺激完好皮肤试验不可能预测多次刺激损伤皮肤（痤疮、去毛的腋下或敏感部位如面部）出现的一些不良反应。小室划痕试验就是用于评价可能作用于损伤皮肤的物质。选择受试敏感者：内前臂暴露于5%十二烷基硫酸钠24h，局部出现严重红斑、水肿和小疱列为受试对象。试验方法：用30号针头，针的斜洞面朝外，在前臂内侧面，以45°划8个十字划痕（每个10mm²），划破表皮不出血为度。将含0.1g受试物（软膏、乳剂、粉剂）的Duhring小室或0.1ml受试物液饱和的衬垫置于划痕皮肤处，透气胶带包裹前臂。每天一次，重复3天。最后一次去掉受试物后30min，观察局部的反应，按表12-4进行评价。求出反应的平均值，受试物反应程度分为极轻微（0～0.41）、轻微（0.5～1.4）、中度（1.5～2.4）和重度刺激（>2.4）。常用划痕指数评价损伤组织对正常组织的相对危险度，划痕指数（scarification index，SI）＝完好皮肤的分值/划痕皮肤的分值。

尽管常规贴片试验过程中肥皂可诱发红斑，但典型的临床反应是干燥，偶尔出现红斑和裂伤。肥皂小室试验用于比较肥皂可能诱导的皲裂。同小室划痕试验一样，首选敏感受试者，或通过氢氧化铵大疱形成时间来筛选。方法：衬垫上加8%的肥皂溶液0.1ml，置于前臂，带孔的胶带固定。第一天（星期一）贴敷24h，随后4天（星期二至五）每天6h。第八天（星期一）观察受试部位的反应，进行评价。每天放置新的贴片前，应检查受试部位，如发现严重的红斑，立刻终止试验。该试验和皮肤洗涤过程有很好的相关性，但可能增强一些物质的刺激反应预测结果。

（三）扩大暴露刺激试验

虽然贴片试验能成功测试出一些物质的刺激强度差异，但消费者实际使用中这种差

异并不明显。扩大暴露刺激试验(exaggerated exposure irritation test)目的就是缩小产品应用和贴片试验反应的不吻合的程度。该方法是用于臂浸泡刺激，比较两种肥皂或两种洗涤剂的相对刺激性。具体方法：8%的皂液盛于水槽中，水温维持在40.5℃，受试者一只手和肘关节以下的部位浸入一种受试物溶液中，另一只手和肘关节以下部位浸入另一受试物溶液中。每天浸10～15min，共5天，或双臂可观察到刺激为止。大多数的受试者，浸泡的前臂部位首先出现红斑反应，随之手变干裂。由于两部位的表现不同，产生了两种相应部位的测试方法：①前臂洗涤试验(anticubital washing test)，每天洗2～3次，肥皂泡可留在皮肤上。评价的终点是红斑和水肿。Frosch等将手臂改为面颊，采用相似的过程观察香皂的刺激作用。反应的严重性用简单的四级，即轻、中、重和严重标准评价。产品之间可根据平均分级或诱发刺激作用的浸洗次数进行比较。②浸手试验，受试人数少(如10名)，两种受试物浓度可相对增加至2%；受试者达64人(采用Latin square dosing pattern)，选取受试物的浓度接近应用浓度。暴露时间为每天浸2～3次，每次10～15min，或每天一次30min。浸手试验主要观察脱皮、裂纹以及红斑反应。

第二节　皮肤致敏和光敏试验

一、皮肤变态反应试验

皮肤变态反应是指通过重复接触某种物质后机体产生免疫传递的反应。化学物质引起的变态性接触性皮炎，属Ⅳ型(即延迟型)变态反应。在人类的反应可能是瘙痒、红斑、丘疹、水疱或大疱，动物仅见皮肤红斑和水肿。

试验方法的原则：①由于接触致敏的发病过程包括致敏(诱导)和激发两个阶段，动物在第一次接触受试物后至少1周，再次给予激发接触。通过激发接触能否引起皮肤反应确定有无致敏作用。②实验首选动物为白色豚鼠，每组动物数10～25只。③受试物剂量(浓度)：致敏(诱导)浓度允许引起皮肤轻度刺激反应(即最高耐受浓度)；激发浓度一般应低于致敏浓度，不得引起原发刺激性皮肤炎症反应。④为避免出现假阳性或假阴性结果，试验中除要求使用的试剂、绷带、胶布均无刺激性外，并设立阳性或阴性对照组。⑤为提高皮肤反应的阳性率(增加敏感性)，通常采用福氏完全佐剂(FCA)，而不影响实验的评价。

福氏完全佐剂(FCA)的制备：轻质石蜡油50ml，羊毛脂(或吐温80)25ml，结核杆菌(灭活)62mg，生理盐水25ml。制成油包水乳化剂后，经高压消毒备用。

(一) 豚鼠最大值试验(皮内和涂皮结合法，GPMT)

试验前24h在豚鼠颈背脊柱两侧4cm×6cm范围内剪毛或脱毛。

从头部向尾部成对地做3次皮内注射：①注射0.1mlFCA；②注射0.1ml受试物；③注射0.1ml受试物与FCA的等量混合物。各点间距1.5cm。注射后第8天，用2cm×4cm滤纸涂以用适当赋形剂(花生油、凡士林、羊毛脂等)配制的受试物，将其贴敷在上背部的注射部位，持续封闭固定48h，作为第二次致敏。为加强致敏作用，对无皮肤刺激作用的化学物质，可在第二次致敏前24h，在注射部位涂抹10%十二烷基硫酸钠(SLS)。对照组仅用溶剂或赋形剂注射或涂抹。激发接触，即在末次致敏后14～48天，分别用

2cm×2cm 的滤纸涂以受试物，再次贴敷在上背部两侧的去毛区，持续封闭和固定 24h。对照动物作同样处理。激发接触后 24、48 和 72h 观察反应，按表 12-5 进行皮肤反应强度评分。

表 12-5　皮肤反应强度评价

皮肤反应	积分
1. 红斑形成	
无红斑	0
轻微可见红斑	1
中度红斑	2
严重红斑	3
水肿性红斑	4
2. 水肿形成	
无水肿	0
轻度水肿	1
中度水肿	2
严重水肿	3
总积分	7

$$平均反应值=[\Sigma(1)+(2)]/合计动物数$$

由于化学物的接触致敏作用并非完全遵循一般的毒理学剂量-反应规律。Mafhusson 按动物致敏百分数提出以下分级标准（表 12-6）。

表 12-6　接触致敏分级标准

致敏率%	分级	强度分类
0～8	Ⅰ	弱致敏物
9～28	Ⅱ	轻度致敏物
29～64	Ⅲ	中度致敏物
65～80	Ⅳ	强度致敏物
81～100	Ⅴ	极强致敏物

结果评价：本试验适用于弱致敏物（化学原料）的筛选。凡能引起 10%以下动物致敏，即 1/15 或 1/20 动物致敏，可认为该受试物为弱致敏物，依以上分级标准类推。由于人群中变态接触性皮炎的发生因素复杂，受到诸多因素如化学物的使用浓度、接触频数、持续时间及接触时原皮肤的健康状况等的影响，试验所得阳性结果应结合人群斑贴试验和流行病学调查进行综合性分析和评价。

（二）豚鼠局部封闭涂皮法

实验前 24h，用脱毛剂将豚鼠背部左侧 3cm×3cm 范围区脱毛。将受试物 0.1～

0.2ml 涂在 2cm×2cm 滤纸上，并将其敷贴在去毛区，二层纱布一层油纸覆盖，再以无刺激胶布封闭固定，持续 6h。第 7 天和第 14 天以同样方法重复一次。激发接触，即末次致敏后 14～28 天，将 0.1～0.2ml 或低于诱导浓度的受试物贴于豚鼠背部右侧 2cm×2cm 去毛区（接触前 24h 脱毛），然后用二层纱布、一层油纸和无刺激胶布固定 6h，将斑贴受试物拿掉，24 和 48h 后观察皮肤反应，按表 12-5 评分。对照动物仅给予激发接触。本试验要求动物数每组 10～20 只。

结果评价：本试验适用于强致敏物（或成品）的筛选。致敏途径与实际接触方式接近，按皮肤反应强度评分标准评价。根据对照组与试验组豚鼠皮肤反应的差别测定变态反应的程度。一般情况下，在豚鼠身上致强过敏物质，可能在人身上引起较严重的变态反应，但在豚鼠身上致弱过敏者有可能或不可能引起人体变态反应。

（三）小鼠致敏试验

尽管豚鼠致敏试验已应用了 40 年，传统的豚鼠致敏试验方法费用相对高且费时；其应用主观的观察终点；一些试验中应用了应急的操作方法，改变了正常的生理参数。近 10 年发展的小鼠致敏试验方法引起人们更大的兴趣。虽然提出许多小鼠致敏测试的方法，仅小鼠耳肿胀试验和局部淋巴结测定两种被认为是标准的致敏试验的替代方法。小鼠耳肿胀试验运用了涂抹和注射暴露诱导、涂抹激发，以测量耳厚代替肉眼观察反应的评价。局部淋巴结测定试验采用涂抹诱导，然后测定引流淋巴结细胞有丝分裂活性。局部淋巴结测定试验在所有的测定方法中是惟一将体内反应展现于体外评价的方法。另外，小鼠维生素 A 增强试验，用于评价消费产品的成分，仅用于少数试验室。整个试验期（诱导和激发期）小鼠喂以高剂量维生素 A 饲料，以增强免疫系统反应，涂皮激发，测量耳厚。

1. 局部淋巴结测定　将小鼠致敏试验中观察小鼠耳肿胀的反应评价改为测量淋巴结增生。

局部淋巴结测定（local lymph node assay）将受试物多次涂抹于小鼠耳部，收集引流的淋巴结细胞体外评价其有丝分裂活性。每组 4 只 CBA/ca 小鼠，至少 3 个剂量组。选用 8～12 周龄小鼠，雌雄均可，但每一个试验仅限用一种性别。

溶剂和试验浓度的选择主要依据溶液或悬液的溶解性和粘稠度。赋形剂可选丙酮橄榄油、丁酮、二甲基甲酰胺、丙二醇或 2.5% 羟丙基纤维素甲醇溶液。所选则的剂量应不引起动物中毒。建议从系列浓度 100%、50%、25%、10%、5%、2.5%、1.0%、0.5%、0.25%、0.1%、0.05% 和 0.01%（1/2 递减）选 3 个连续浓度作为试验浓度。

25μl 适当量的受试物溶液或溶剂涂布于鼠耳背面，每天一次，连续三天。第五天，尾静脉注射 250ml 含 20μci 甲基胸腺嘧啶脱氧核苷（methyl thymidine）的磷酸盐缓冲液（PBS）。注射后 5h，二氧化碳窒息处死小鼠，剔除耳引流淋巴结。收集同一组小鼠的淋巴结轻轻地通过 200 目的不锈钢筛，制备单细胞悬液。悬液 190g 离心 10min，沉淀用 10ml PBS 洗 2 次。细胞加入 3ml 5% 三氯乙酸，4℃ 放置过夜。离心收集沉淀的大分子，弃上清液，沉淀再加 1ml 三氯乙酸混匀，然后加 10ml 闪烁液，用 β 闪烁计数器测定蜕变数/min。计算每组每个淋巴结的平均蜕变数，该试验剂量组的 ^{3}H TdR 掺入率＝每个试验剂量组掺入 ^{3}H TdR 数/对照组掺入 ^{3}H TdR 数，^{3}H TdR 掺入率 2～3 为阳性致敏物。

该方法的优点是可快速筛选一些强的致敏原、所用动物数少、费用低且省时。

2. 小鼠耳肿胀试验（mouse ear swelling test，MEST）

动物：6～8周龄雌性CF 1、Blab c或SW小鼠。实验组每组10～15只，对照组5只。

溶剂：根据受试物的溶解性和相容性（chemical compatibility）选择溶剂。丙酮、丁酮或70%、80%、95%乙醇均可。

剂量：主要依据受试化合物皮肤刺激毒性范围，诱导选用最小刺激或无刺激浓度，激发选用最高无刺激浓度。

步骤：脱干净小鼠腹部的毛，可先用电推子剃毛，然后再用外科胶布粘剥干净残留的毛至皮肤光亮。沿着脱毛区的两边皮内各注射0.05ml弗氏佐剂。脱毛的中心部位注射0.1ml适当浓度的受试物或溶剂，每天一次，连续4天，注意每次注射前要将新长出的毛粘剥干净。末次诱导后7天，将20μl适当浓度的受试物涂于每只小鼠（试验和对照组）的单侧耳朵，另一侧耳涂10μl溶剂进行激发。分别在激发前、激发后24和48小时测量耳厚。为使动物安静便于测量，可用乙醚轻度麻醉小鼠。每只鼠受试物涂布的耳厚/该鼠溶剂涂布的耳厚≥2～3被认为是阳性反应。计算试验组和对照组的阳性率。对照组的阳性率应小于10%，如大于10%，应降低受试物的浓度进行激发试验。

小鼠耳肿胀试验（MEST）的阳性率低于豚鼠最大化实验（GPMT），弱和中度致敏物不易检测出。US EPA已将小鼠耳肿胀试验作为毒物控制法规（Toxic Subatances Control Act）化学品注册的检测方法。

（四）人体激发斑贴试验和试用试验

1. 激发斑贴试验　是借用皮肤科临床检测接触性皮炎致敏原的方法，进一步模拟人体致敏的全过程，预测受试物的潜在致敏原性。

（1）人体激发斑贴试验方法的原则

1）实验全过程应包括诱导期、中间休止期及激发期。

2）受试物（可疑致敏原）与皮肤有充分接触时间。

3）选择合适敏感斑贴部位，如人体上背部或前臂屈侧皮肤。

4）受试者应无过敏史，样本数不少于25人。

5）实验前应向受试者详细介绍实验目的和方法，以取得知情同意。

（2）操作步骤

1）将1%十二烷基硫酸钠（SLS）液0.1ml滴在2cm×2cm大小的四层纱布上，然后敷贴在受试者上背部或前臂屈侧皮肤上，再用玻璃纸覆盖，用无刺激胶布固定。24h后将敷贴物去掉，皮肤应出现中度红斑反应。如无此反应，调节SLS浓度或再重复一次。

2）将0.2ml(g)受试物按上述方法敷贴在同一部位上，固定48h后，去掉斑贴物，休息一日。

3）重复2）步骤，共4次。如试验中皮肤出现明显反应，诱导可停止。

4）于最后一次诱导两周，选择未做斑贴的上背部或前臂屈侧皮肤两块，间距3cm，一块作对照，一块敷贴含上述受试物0.2ml(g)的1cm×1cm纱布，封闭固定48h后，去除斑贴物，立即观察皮肤反应。24、48和72h再观察皮肤反应的发展或消失情况。按表12-7和表12-8进行皮肤反应评定。

（3）结果评定：如人体斑贴试验表明受试物为轻度致敏原，可作出禁止生产和销售的评价。

2. 人体试用试验

(1)人体试用的原则及方法

1)志愿者按日常使用方法或选用前臂屈侧 5cm×5cm 皮肤进行受试物试用试验。

2)样本数为 200 人。

表 12-7　皮肤反应评价

皮肤反应	分级
无反应	0
红斑和轻度水肿、偶见丘疹	1
浸润红斑、丘疹隆起、偶而可见水疱	2
明显浸润红斑，大小水疱融合	3

表 12-8　致敏比例评价

致敏比例	分级	分类
0～2 25	1	弱致敏原
3～7 25	2	轻度致敏原
8　13 25	3	中度致敏原
14～20 25	4	强致敏原
21～25 25	5	极强致敏原

3)受试物每天使用 1～2 次，连续试用 30 天以上。

4)每周至少观察一次，记录受试者主诉，如痒、热、刺痛感觉等或皮肤反应，如皮肤脱屑、皲裂、红斑、水肿、丘疹、水疱、痤疮或色素沉着等。

(2)结果评价：200 名受试者中有 1 个人出现上述主诉和体征，均可认为该受试物有皮肤刺激或致敏作用。结合化妆品的试用情况以及动物试验结果，作出是否安全的评价。

二、皮肤光毒和光变态反应试验

皮肤光变态反应是指某些化学物质在光能参与下所产生的抗原抗体皮肤反应。不通过机体免疫机制，而由光能直接加强化学物质所致的原发皮肤反应，则称为光毒反应。

试验方法的原则：①首选动物为白色豚鼠和白色家兔，每组动物 8～10 只。②照射源一般采用治疗用汞水银灯，水冷式石英灯作光源，波长在 280～320nm 范围的中波紫外线或波长在 320～400nm 范围的长波紫外线。③照射剂量引起最小红斑量(MED)的照射时间和最适距离来控制。一般需做预备试验确定 MED 值。④受试物浓度采用原液或按人类实际用浓度，光变态反应试验的激发接触浓度可采用适当的稀释浓度。采用无光感作用的丙酮或酒精作稀释剂。⑤光变态反应试验需采用阳性对照，常用阳性光感物为四氯水杨酰替苯胺。⑥光源照射前应使受试物有足够的时间穿透皮肤，一般大于 30min，并确证受试物存留在皮肤内。⑦如已证明受试物具有光毒性，可以不做光变态反应试验。

(一) 皮肤光毒试验方法

先将实验动物背部脊柱一侧的毛剪掉，去毛范围为 3cm×8cm。用中波紫外线灯照

射去毛区,时间以秒为单位,分几档,测定 MED。观察确定照射后 8～12h 引起一度红斑(刚刚可见)的照射时间为 1 个 MED。预试验 3 天后,用剪刀再将实验动物背部脊柱两侧去毛共 4 块,范围每块 2cm×2cm。将受试物 0.05～0.1ml(g)均匀涂在 2 块脱毛区,并用黑纸覆盖避光。涂药 30min 后,第一脱毛区用亚 MED 的中波紫外线灯照射;第二脱毛区用黑纸覆盖不予照射;第三区仅用亚 MED 的中波紫外线照射,不涂药;第四区作空白对照,不给予任何处理。照射后 1、24 和 48h,观察皮肤反应,按表 12-5 进行皮肤反应强度的评价。

结果评价:凡实验动物第一次与受试物接触,并在光能作用下引起类似晒斑的局部皮肤炎症反应,即可认为该受试物具有光毒作用。

(二) 皮肤光变态反应试验

1. 诱导阶段

(1)实验动物颈部用脱毛剂脱毛 2cm×4cm,于脱毛区四角皮内注射福氏完全佐剂(FCA)各 0.1ml。

(2)于脱毛区涂 20% 十二烷基硫酸钠(SLS)溶液,再将受试物 0.1ml(g)涂在该脱毛部位。

(3)用波长在 280～400nm 的中长波紫外线灯照射涂药部位,距离和时间以产生明显红斑为准。中波紫外线的照射剂量为 6.6J/cm^2,长波紫外线为 10J/cm^2。

(4)隔日重复 2 及 3 步骤。共 5 次。

2. 激发阶段 于诱导操作后两周,将实验动物背部脊柱两侧脱毛 1.5cm×1.5cm 块,共 4 块。第 1 块涂受试物 0.1ml 后 30min 用长波紫外线照射;第 2 块涂受试物后用黑纸遮盖不照射;第 3 块不涂受试物,仅用长波紫外线照射;第 4 块用黑纸遮盖,不涂受试物,亦不照射。照射后 24、48 和 72h,观察皮肤反应,按表 12-5 进行皮肤反应强度评分。

3. 结果评价 凡化学物质单独与皮肤接触无作用,经过激发接触和特定波长光照射后,局部皮肤出现红斑、水肿,甚至全身反应,而未照射部位无此反应,可认为该受试物是光敏感物质。

第三节 皮肤吸收试验

在生产和生活中,有不少化学物质能经过皮肤吸收引起中毒。测定经皮吸收试验可作为评价毒物危害程度的指标之一,并可比较不同毒物经皮吸收能力的大小,为防治对策提供一些依据。常用的经皮吸收的方法有:在体测定涂在动物皮肤表面上的毒物减少量,测定机体组织和体液中经皮吸收的物质原型或其代谢产物,以及离体皮肤吸收试验。各种方法都有其局限性,可以相互补充,可根据试验的目的不同选择适宜的试验方法。

一、在体皮肤吸收试验

(一) 测定皮肤表面放射性标记化合物的减少量

先在动物皮肤上定量涂布放射性核素标记化合物,然后测定皮肤表面放射性物质的减少量。

动物皮肤按常规去毛,在一定面积皮肤表面定量涂布所研究的标记化合物,然后在严

格固定距离的情况下，用放射性探测器连续进行测定。根据不同的放射线，选择灵敏的相应探头。按指数规律方程式计算吸收速度。

$$I_t = I_0 \times e^{-k(t-t_0)}$$

$$K = (\log I_0 - \log I_t) / 0.4343(t_t - t_0)$$

I_0：时间为 t_0 时，在皮肤涂药处的最初计数率（脉冲数/分）；

I_t：时间为 t_t 时，在皮肤涂药处的最初计数率（脉冲数/分）；

K：消失常数，具有时间因素，每分钟所消失的数值，相当于皮肤所吸收的数值。

有些化学毒物的经皮吸收，可能不呈指数规律，则不能应用此式，而应经反复试验后，另行配出相应的方程式，然后再计算吸收率。

注意事项：①由于放射性测定的距离需要准确，因此动物以保持安静为佳，根据不同情况给予麻醉剂。②涂布放射性量需大于本底 20 倍。③在毒物涂布后的开始半小时内，放射性的下降非常迅速，可能被皮肤附属器所吸附，并不能真正反应毒物进入体内的动态。在评价时必须考虑这一因素，这也是本法不足之处。④若被研究的标记物具有一定的挥发性，在估价吸收速度时要附加这一因素。

（二）测定涂皮的标记化合物在组织或体液中的放射性

动物去毛，在固定位置上涂布放射性标记化合物，在不同的时间抽取静脉血，测定放射性，可了解毒物经皮吸收情况。也可在不同时间中分批处死动物，测定各脏器组织中的放射性，以了解该毒物经皮吸收后，在体内的分布动态。也可以配合测定其他的毒效应指标，如有机磷经皮肤吸收可测定体内胆碱酯酶的活性。

本试验方法必须考虑到所标记化合物要有足够高的比放射性，使标记化合物在体内经体液稀释或代谢后，仍能明显测出，但又不能因过量的辐射损伤，损害皮肤从而加速吸收。

其他注意事项：化合物本身的物理化学特性与皮肤的吸收有关。已知脂水分配系数和皮肤通透性相关。分子量小于 400 的物质较大分子更易于吸收。一般非极性分子比极性分子易于穿透皮肤。羟基的化合物通透性降低。脂溶性赋形剂可增加穿透力。电解质不能穿透皮肤，一些物质可通过皮肤附属器进入皮肤。经皮吸收存在物种差异。同一物质，大鼠和兔的皮肤吸收高于人，猴和猪皮肤通透性与人相似；试验过程中避免动物舔食受试物；使用特制的装置收集尿液和粪便。选择受试动物、试验设计以及结果分析时应考虑到这些影响因素。

二、离体皮肤吸收试验

（一）离体兔耳涂布法

用离体兔耳，在耳动、静脉各插入导管，并把兔耳其余静脉结扎。然后，在耳上涂以受试物或将耳浸入受试物溶液中。动脉导管中加压灌注林格氏溶液或其他灌注液，在不同时间内收集静脉中回流的液体，分析测定回流液中的毒物量，即可知道该毒物经皮肤吸收的情况。此法的优点是对毒物进入血流的动态能提供较为准确的结果，并适用于放射性或非放射性试验；缺点是这些结果只有在试验开始的 2～3h 内是正确的，以后则由于离体耳朵的水肿，试验结果出现严重的误差。此外，灌注液的选择也非常重要。

（二）离体的人或动物皮肤测试化学物质的穿透能力

基本的测试方法是将皮肤(表皮朝上暴露于空气)撑平置于收集容器的开口上,皮肤底面浸在生理盐水或其他的容纳液中,受试物涂于表皮,穿透皮肤的化学物质收集于下方的容器中,可随时进行测试。容纳液小室底部不断搅动,以维持生理温度。试验中可根据需要选用全皮(fullthickness)或表皮(epidermis)。毛少皮肤可用热处理分开表皮和真皮。受试物常用放射活性物质进行标记。

该方法的优点:可用人的皮肤进行化合物高毒性试验;可同时进行多种试验;膜渗滤排除其他药物动力学的影响;费用较低,且方法较简单。缺点:使用保存的人皮肤,一些酶活性可能丢失,化合物的代谢谱可能改变;对在体的皮肤,穿透表皮的化学物质可进人位于表皮下的血管和淋巴管循环;离体试验将穿透皮肤的物质收集于生理盐水中,亲水和疏水化合物的相对溶解性可能会发生变化;剔除皮肤的表面不同于正常皮肤,保存过程可能会发生改变;这些均可影响皮肤的吸收和代谢。

对大多数化合物来说,断奶小猪和微型猪皮肤以及猴皮肤是较好的试验材料。小鼠和无毛小鼠皮肤比其他物种皮肤通透性高。大鼠皮肤仅适宜少部分化合物。

(裴秋玲)

参考文献

1. 张桥. 卫生毒理学基础. 第三版. 北京:人民卫生出版社,2000
2. 刘毓谷. 卫生毒理学基础. 第二版. 北京:人民卫生出版社,1994
3. 秦春华. 化学物致突变致癌检测技术. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1996
4. 周宗灿. 毒理学基础. 北京:北京医科大学出版社,2000
5. 李勇,张天宝. 发育毒理学-研究方法和实验技术. 北京:北京医科大学出版社,2000
6. 张均田. 现代药理实验方法. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1998
7. 李影林. 中华医学检验全书. 北京:人民卫生出版社,2000
8. 徐叔云,卞如敏等. 药理实验方法学. 第三版. 北京:人民卫生出版社,2002
9. 郑德先,吴克复等. 现代实验血液学研究方法与技术. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1999
10. 张之南,李蓉生. 红细胞疾病基础与临床. 北京:科学出版社,2000
11. 艾辉胜,罗荣城等. 现代白血病学. 北京:人民军医出版社,1997
12. 徐功立,杨道理等. 当代血液病的诊治和实验室检查技术. 济南:山东科学技术出版社,2001
13. 鄂征. 细胞培养和分子细胞学技术. 第二版. 北京出版社. 1997
14. 穆魁津,林友华. 肺功能测定原理与临床应用. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1992
15. 方福德,周吕等. 现代医学实验技巧全书. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1995
16. 施新猷. 现代医学实验动物学. 北京:人民军医出版社,2000
17. 杨贵贞. 边缘免疫学. 北京:北京科学出版社,2001
18. 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 北京:高等教育出版社,1993
19. 李永明. 实用分子生物学方法手册. 北京:科学出版社,1998
20. 陈赛娟. 人类基因组研究基本技术. 北京:人民军医出版社,2002
21. 夏佑林. 生物大分子多维核磁共振. 合肥:中国科学技术大学出版社,1999
22. 夏宏器. 实用心功能学. 北京:中国医药科技出版社,1993
23. 江泉观. 基础毒理学. 北京:化学工业出版社,1991
24. Hayes AW. Principles and Methods of Toxicology, 4th ed. New York: Raven Press, 2001
25. Derelanko MJ and Hollinger MA. CRC Handbook of Toxicology. Boca Raton: CRC Press, 1995
26. Ecobichon DJ. The basis of toxicity testing, 2nd ed. New York: CRC Press, 1997
27. Hans Marquardt, Siegfried G. Schäfer, Roger McClellan, Frank Wetsch. Toxicology: San Diego Academic Press. 1999
28. Wallace Hayes. Principles and Methods of Toxicology. 5th Edtion. Philadelphia: Taylor & Francis, 2001
29. Klaassen CD. Casarett and Doull's Toxicology: the Basic Science of Poisons. Sixth Edition. New York McGraw-Hill, 2001

30. Hayes AW. Principles and Methods of Toxicology. Fourth Edition. Tayor and Francis, Phliladelphia, 2001
31. Glenn Sipes, Charlene A. McQueen, A. Jay Gandolfi. Comprehensive Toxicology; John C. Bloom. Volume 4: Toxicology of the Hematopoietic System. Elsivier Science Ltd. 1997
32. Curtis D. Klaassen. Casarett & Doull's Toxicology. The basic science of Poisons. Fifth edition. McGraw-Hill companies, Inc. 1998

责任编辑 王凤丽

封面设计 赵京津

版式设计 盖 伟

责任校对 李 华



ISBN 7-117-05661-4

定 价：18.00 元